

KINETISCHE UND PRÄPARATIVE
UNTERSUCHUNGEN AN DER NADPH:
 Δ^4 -3 - KETOSTEROID-OXIDOREDUKTASE
(E. C. 1.3.1.4.) AUS LEBERMIKROSOMEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
der Justus Liebig-Universität Giessen
(Fachbereich Biologie)

vorgelegt von
Sighart Golf
aus
Malenz

Giessen, Herbst 1972

1973
—

**KINETISCHE UND PRÄPARATIVE
UNTERSUCHUNGEN AN DER NADPH:
 Δ^4 -3 - KETOSTEROID-OXIDOREDUKTASE
(E. C. 1.3.1.4.) AUS LEBERMİKROSOMEN**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
der Justus Liebig-Universität Giessen
(Fachbereich Biologie)**

vorgelegt von

Sighart Golf

aus

Malenz

Giessen, Herbst 1972



Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Lueken

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hansjürgen Staudinger,
Dekan des Fachbereiches Medizin**

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Cleffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 1973

Inhaltsverzeichnis

=====

1. Problemstellung	1
2. Einleitung	2
3. Material und Methoden	7
3.1. Material	7
3.1.1. Versuchstiere	7
3.1.2. Chemikalien	7
3.2. Methoden	9
3.2.1. Proteinbestimmung	9
3.2.1.1. Proteinbestimmung nach Folin-Miller	9
3.2.1.1.1. Folinreagenz	9
3.2.1.1.2. Alkalisches Kupferreagenz	9
3.2.1.1.3. Protein-Standard	10
3.2.1.1.4. Proteinbestimmung	10
3.2.1.2. Proteinbestimmung nach Biuret	10
3.2.1.2.1. Biuret-Reagenz	10
3.2.1.2.2. Proteinbestimmung	10
3.2.1.3. Vergleich Biuret-Folin-Methode	11
3.2.1.4. Proteinbestimmung nach Warburg	11
3.2.2. Gewinnung von Rattenleber-Mikrosomen	11
3.2.3. Enzymatische Tests	12
3.2.3.1. Der optische Test für die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase	12
3.2.3.2. Die INH-Reaktion	13
3.2.3.2.1. Die Standard-Kurve	13
3.2.3.2.2. Inkubation der Steroide und Extraktion	13
3.2.3.3. Gas-Chromatographie	14
3.2.3.3.1. Bestimmung des Faktors	14
3.2.3.3.2. Untersuchung der Pro- dukte der NADPH: Δ^4 -3-	15
Ketosteroid-Oxidoreduktase	15
3.2.3.4. Der optische Test für die NADPH: Cyto- chrom c-Oxidoreduktase	15
3.2.3.5. Der optische Test für die NADPH: Vita- min K_3 -Oxidoreduktase	16

3.2.3.6.	Der optische Test für die NADPH: DCPIP-Oxidoreduktase	16
3.2.4.	Zwei-Substrate-Kinetik	16
3.2.5.	Solubilisieren der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid- Reduktase	17
3.2.5.1.	Durch Beschallen	17
3.2.5.2.	Durch Butanol-Extraktion	17
3.2.5.3.	Durch Aceton-Extraktion	18
3.2.5.4.	Durch Detergenzien	18
3.2.6.	Ionenaustauscher-Chromatographie an Säulen .	18
3.2.7.	Fraktionieren von Proteinen mit Ammonium- sulfat	19
3.2.8.	Stabilitätsuntersuchungen zur solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase unter Ausschluß von Sauerstoff	20
3.2.9.	Statistik	21
4.	Resultate	23
4.1.	Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit	23
4.2.	Über die Reduktion von Testosteron zu Dihydro- testosteron und 3 α -17 β -Androstandiol sowie 3 β -17 β - Androstandiol.	25
4.3.	Die Abhängigkeit der NADPH-Oxidation im optischen Test von der Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität	26
4.4.	Hemmstoffversuche	29
4.4.1.	Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch 2,4-Dinitrophenol	30
4.4.2.	Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Penta- chlorophenol.	31
4.4.3.	Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch TTA .	32
4.4.4.	Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin	32
4.4.5.	Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch NADP ⁺	33
4.4.6.	Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Gallus- säurepropylester.	34
4.4.7.	Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch weitere Hemmstoffe	34
4.4.8.	Hemmung der mit Lubrol WX solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase	34
4.4.8.1.	Durch 2,4-Dinitrophenol	34
4.4.8.2.	Durch Pentachlorophenol	34

4.4.8.3. Durch TTA	35
4.4.8.4. Durch Atebrin	35
4.4.9. Übersicht über die Hemmstoffversuche	37
4.4.10. Zuordnung der Hemmstoffe 2,4-Dinitrophenol, Pentachlorophenol, TTA und Atebrin zu Rezep- torseiten an der Steroid-5 α -Reduktase	35
4.5. Kinetische Experimente, die zur Aufklärung der an der Steroid-5 α -Reduktion beteiligten Faktoren führen	39
4.5.1. Aktivierung der Steroid-5 α -Reduktase durch Vitamin K ₃ in Gegenwart von Tris-HCl	39
4.5.2. Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin	40
4.5.2.1. Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin in Gegenwart von Vita- min K ₃	41
4.5.3. Substratsättigungs-Kurve (K ₃) der NADPH: K ₃ -Oxidoreduktase	42
4.5.3.1. Substratsättigungs-Kurve (NADPH) der NADPH: Vitamin K ₃ -Oxidoreduktase	43
4.5.4. Fraktionierung der solubilisierten Steroid-5 α - Reduktase sowie der NADPH: H ₂ -Akzeptor-Reduk- tasen durch Ammoniumsulfat	44
4.5.5. Zwei-Substrate-Kinetik	45
4.5.5.1. Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: DCPIP-Reduktase mit Testosteron und DCPIP	45
4.5.5.2. Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: K ₃ - Reduktase mit Vitamin K ₃ und Testosteron	46
4.5.5.3. Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: Cytochrom c-Reduktase mit Cytochrom c und Testosteron	47
4.5.6. Abhängigkeit der Testosteron-Reduktion von re- duzierten Chinon-Verbindungen	49
4.6. Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase	51
4.6.1. Solubilisierung durch Beschallen	52
4.6.1.1. Fraktionierung von Rattenlebermikro- somen durch Beschallen	52
4.6.2. Solubilisierung durch Detergenzien	56

4.6.2.1.	Versuche zur Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase mit Detergenzien, Glycerin und Effektoren	57
4.6.2.2.	Der Einfluß von Natriumzitrat auf die Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase durch Lubrol WX	58
4.7.	Untersuchungen zur Stabilität der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase	60
4.7.1.	Über die Stabilität der unter 4.6.2.1. beschriebenen solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase	60
4.7.2.	Über die Stabilität der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase bei variierten Glycerin- und Lubrol-Konzentrationen	60
4.7.3.	Über die Stabilität der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase bei verschiedenen Wasserstoffionen-Konzentrationen	61
4.7.4.	Über die Stabilität der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase durch weitere Addition von Detergenzien	62
4.7.5.	Über die Stabilität der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase unter Ausschluß von Sauerstoff	62
4.8.	Säulen-Chromatographie mit Cellulose-Ionenaustauscher-Material	63
4.8.1.	Bestimmung der optimalen Wasserstoffionen-Konzentration für die Ionenaustauscher-Chromatographie	63
4.8.1.1.	DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 6,5	63
4.8.1.2.	DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 7,0	63
4.8.1.3.	DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 7,7	65
4.8.1.4.	CM-Cellulose-Chromatographie bei pH 6,5	65
4.8.2.	Der Einfluß von EDTA auf die Stabilität der Steroid-5 α -Reduktase bei der DEAE-Cellulose-Chromatographie	65

4.8.3. TEAE-Cellulose-Chromatographie	66
4.8.4. DEAE-Cellulose-Chromatographie mit erhöhten Glycerin-Konzentrationen	66
4.9. Ammoniumsulfat-Fraktionierung der solubilisierten Mikrosomen	66
4.10. Reinigung der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase mit Hilfe der DEAE-Cellulose-Chromatographie und anschließender Ammoniumsulfat-Fraktionierung	68
5. Diskussion	69
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis	80

Häufig verwendete Abkürzungen:

Steroid-5 α -Reduktase	: NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase
INH	: Isonicotinsäure-Hydrazid
DEAE-	: Diäthyl-Aminoäthyl-
TEAE-	: Triäthyl-Aminoäthyl-
NADPH (NADP ⁺)	: Nicotinsäure-adenin-dinucleotid-Phosphat, reduziert
NADH (NAD ⁺)	: Nicotinsäure-adenin-dinucleotid, reduziert
DCPIP	: Dichlorophenol-Indophenol
EDTA	: Äthylendiamin-tetraessigsäure
Tris-HCl	: Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-
TTA	: 1-(2-Thienyl)- 4,4,4-trifluor-1,3-butandion
DT	: 5 α -Dihydrotestosteron
AD	: Androstandiol
spez. Akt.	: spezifische Aktivität
K _m	: Michaelis-Konstante
V _{max}	: Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
K _i	: Inhibitorkonstante

1. Problemstellung

=====

Die vorliegende Dissertation sollte aufklären, welche Faktoren an der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase beteiligt sind. In diesem Zusammenhang war es interessant festzustellen, ob Flavoproteine oder z.B. das Cytochrom P₄₅₀ an dem Elektronentransport vom NADPH auf Testosteron teilnehmen. Weiterhin sollte versucht werden, die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase, falls überhaupt möglich, zu solubilisieren und anzureichern.

2. Einleitung

=====

Seitdem die enzymatische 5α -Reduktion von Δ^4 -Steroiden vor über 30 Jahren zum ersten Mal beobachtet wurde (1,2) ist über Struktur und Funktion dieses Enzyms viel Widersprüchliches bekannt geworden. Inzwischen konnte aber bewiesen werden, daß die Steroid- 5α -Reduktase als membrangebundenes Enzym am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (3,4), während die Steroid- 5β -Reduktase in der Zelle im Cytoplasma gelöst vorliegt. Die Steroid- 5α -Reduktase kommt in vielen Organen von Tieren vor, ihre Aktivität wurde in der Leber (5) von vielen Arten, in der ventralen Prostrata von Ratten (6), in der neonatalen Vorhaut des Menschen (7), im Ratten-Ovar (8), in der Nebennierenrinde von vielen Arten (9) sowie in der vaginalen Mucosa von Ratten (66) beobachtet.

Die Aktivität der Steroid- 5α -Reduktase ist in einzelnen Organen verschiedener Tiere verschieden hoch. Beim männlichen Meer-schweinchen ist die Aktivität dieses Enzyms in der Nebennierenrinde sehr hoch, in der Leber dagegen gering (9). Das gleiche wurde in der männlichen Ratte gefunden (10). Dagegen besitzt die Nebennierenrinde des Rindes nur eine geringe und die Nebennierenrinde des Huhnes kaum eine Aktivität (9). Von der Leber des männlichen Hamsters wird der Ring A der Steroide wesentlich schneller reduziert als von der Leber des weiblichen Tieres (11).

Verschiedene Arbeitsgruppen diskutierten die Aktivität der Steroid- 5α -Reduktase. LEYBOLD und STAUDINGER (12) konnten beobachten, daß hydrophile Steroide langsamer reduziert werden als weniger hydrophile. Die Reihenfolge der Reduktionsgeschwindigkeit wird mit Testosteron $\succ$ Progesteron $\succ$ Cortexon $\succ$ Corticosteron, Cortison, Cortisol angegeben.

Werden hydroxilierte Δ^4 -3-Ketosteroide als Substrat angeboten, beobachtet man, daß die Steroid- 5α -Reduktase-Aktivität umso höher ist, je weiter die OH-Gruppe von der Δ^4 -3-Ketogruppe entfernt ist (13); 16- bzw. 18-Hydroxygruppen zeigen keinen Effekt, 11 β -, 11 α -, 7 α -, 2 α -, 2 β -, 6 α -, 6 β -Hydroxygruppen hemmen in steigen-

der Reihenfolge die Δ^4 -3-Keto-Reduktion.

Die Frage, ob eine oder verschiedene Steroid-5 α -Reduktasen mit breiter oder sehr enger Spezifität für verschiedene Steroide vorliegen, kann nicht endgültig beantwortet werden. In den Mikrosomen der menschlichen Haut z.B. wird die Reduktion von Testosteron durch Progesteron oder Androstendion und Desoxycorticosteron kompetitiv gehemmt, wobei der Inhibitor eine Δ^4 -3-Keto-Gruppe aufweisen muß. Dies deutet darauf hin, daß ein Enzym für die Reduktion verschiedener Δ^4 -3-Ketosteroide verantwortlich ist. Ebenso berichtet GOLD (14) über parallele Verzögerungen in der Plasma-Clearance von Cortisol und 11-Desoxy-Cortisol bei Lebererkrankungen und Hyperthyroidismus, was darauf schließen läßt, daß der Katabolismus dieser beiden Steroide in dem gleichen Ausmaß beeinflusst wird. In der Ratten-Prostrata soll nur eine Steroid-5 α -Reduktase mit breiter Spezifität vorkommen, die am Nucleus der Zellen lokalisiert ist (32). Andererseits jedoch haben Mc GUIRE und TOMKINS Hinweise dafür geliefert (5, 15, 16), daß die Δ^4 -3-Keto-Hydrogenierung in der Rattenleber durch eine Anzahl von Enzymen hoher Substratspezifität katalysiert wird. Differentielle Effekte auf die Reduktase-Aktivitäten bei fünf verschiedenen Steroiden nach Thyroxin-Gabe, Altern oder Äthanol-Behandlung lassen die multiple Natur der Δ^4 -3-Keto-Reduktase in Rattenlebermikrosomen erkennen. Ebenso kann beobachtet werden, daß bei Menschen mit Leberzirrhose spezifisch (17) nur die Reduktion von Cortisol, nicht aber die der anderen Corticosteroide verzögert wird.

Die Reduktionsrate der 4,5-Doppelbindung wird durch eine große Zahl von Faktoren beeinflusst. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gefunden (18, 19, 20), daß die Mikrosomen von weiblichen Rattenlebern mehr Δ^4 -3-Keto-Reduktase-Aktivität enthalten als die von männlichen Ratten. Die Steroid-5 α -Reduktase erweist sich in ihrer Aktivität abhängig vom Alter der Ratte. Das Maximum der Aktivität wird nach sechzig Tagen erreicht, bleibt dann konstant bis zu 120 Tagen nach der Geburt und sinkt anschließend wieder ab (21). Ovariektomie oder Östrogen-Behandlung zeigen nur wenig Einfluß (18, 20, 22), während Testosteron-Behandlung die Δ^4 -3-Keto-Reduktase-Aktivität vermindert und Kastration diese

erhöht. Dies gilt besonders für junge Ratten (20, 22). Allerdings vermindert Testosteron-Zugabe die Steroid-5 α -Reduktion nach Kastration nur bis auf die ursprüngliche Höhe (23). Zusätzliche Thyroxin-Gabe bleibt ohne Wirkung. Die Aktivitäten der Steroid-5 α -Reduktase nehmen in der männlichen Ratte nach Cortison-Behandlung ab. Eine Beeinflussung durch Adrenalectomie konnte bislang jedoch nicht bewiesen werden (22, 24). Da die Geschlechts-Unterschiede schon in Ratten auftreten, die lange vor der Pubertät gonadektomiert wurden, scheint der primäre Einfluß auf die Δ^4 -3-Keto-Reduktase-Aktivitäten nicht in den Gonaden lokalisiert zu sein (20). Hypophysektomie senkt entscheidend die Δ^4 -3-Keto-Reduktase-Aktivität (18), und Thyroxin-Gabe stimuliert die Reduktion der Δ^4 -3-Keto-Steroide, indem mehr NADPH zur Verfügung gestellt und weiterhin die absolute Δ^4 -3-Keto-Reduktase-Aktivität erhöht wird (25). Allerdings scheint dabei nur die 5 α -Reduktion, nicht aber die 5 β -Reduktion anzusteigen (26). Andererseits wird berichtet, daß Thyroxin-Behandlung nur in männlichen Rattenlebermikrosomen eine Steigerung der Δ^4 -3-Keto-Reduktase-Aktivität bewirkt, nicht jedoch in weiblichen Ratten (23). Durch Zugabe von Medroxyprogesteron-Acetat kann man eine zwei-bis fünffache Steigerung der Steroid-5 α -Reduktion feststellen (27, 28).

Die Δ^4 -3-Keto-Hydrogenierung von Corticosteron in der Leber von männlichen und weiblichen Ratten scheint linear mit der Nahrungsaufnahme zu steigen (29). "In vivo"-Untersuchungen zeigten, daß eine Abnahme der Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität durch Hungern zum Teil darauf zurückzuführen ist, daß weniger NADPH zur Verfügung steht, zum anderen aber auch auf eine direkte Abnahme der Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität (30, 31).

Als Coenzym und Wasserstoffdonator wird in der Steroid-5 α -Reduktion fast ausschließlich NADPH (7,33) und unter bestimmten Umständen auch NADH benötigt. In Gegenwart einer optimalen Phosphat- oder Arsenat-Konzentration von 2×10^{-1} M kann auch NADH als Wasserstoffdonator eingesetzt werden (34, 35), allerdings nicht vollständig bei der Reduktion der Steroide Corticosteron, Cortisol und Cortison (12).

Bei der Reduktion des A-Ringes der Steroide ist der erste und wahrscheinlich geschwindigkeitsbestimmende Schritt die irreversible Reduktion der 4,5-Doppelbindung (36), und erst anschließend wird die 3-Keto-Gruppe zu der entsprechenden 3α - oder 3β -ol-Gruppe reduziert. Allerdings sind die verfügbaren Daten in der Literatur nicht einheitlich. In Rattenlebermikrosomen soll bei weiblichen Tieren die 3β -Reduktion der geschwindigkeitslimitierende Schritt sein, in männlichen Ratten die 5α -Reduktion. Dabei wurden ausschließlich 3β -Verbindungen gefunden (37). In Mikrosomen vom Ovar der Ratte ist bei der Progesteron-Reduktion der Hauptmetabolit die 3β - 5α -Verbindung, 3β - 5α -Pregnan-20-on (38). In Homogenaten der menschlichen Haut und vaginalen Mucosa treten sowohl 3α - 5α - als auch 3β - 5α -Verbindungen als Progesteron-Metaboliten auf. Die entsprechenden 5β -Verbindungen wurden nicht beobachtet (9a). In Rattenovar-Mikrosomen wird aus Progesteron nur 3β - 5α -Pregnan-20-on gebildet, und ein lösliches Enzym soll eine irreversible 3β - 3α -Epimerisierung bewirken (8). Auf der anderen Seite berichten REPKE und SAMUELS (39, 40), daß in Rattenlebermikrosomen sowohl eine 3β - als auch eine 3α -Hydrosteroid-Dehydrogenase vorkommen, die sowohl in ihrer Abhängigkeit von NAD^+ und NADP^+ als auch in ihrer relativen Affinität zu NADH und NADPH zu unterscheiden sind. Dabei soll in weiblichen Ratten die 3α -Hydrogenierung wesentlich aktiver sein als die 3β -Reduktion (41, 42).

In Rattenlebermikrosomen werden die Elektronen fünfmal schneller von der B-Seite von NADPH als von der A-Seite in einer cis-Addition auf Testosteron übertragen, ähnlich wie durch die 5α -Dihydrotestosteron-Dehydrogenase von Nocardia restrictus, einem löslichen Enzym, eine cis-Abtrennung der Elektronen von der 4,5-Bindung katalysiert wird (44).

Über den genauen Mechanismus der 5α -Steroid-Reduktion liegen noch keine Ergebnisse vor. Eine 5β -Steroid-Reduktase wurde aus Pseudomonas testosteroni isoliert, welche FMN als prosthetische Gruppe besitzt (45). Weiterhin benötigt dieses Enzym Coenzym Q_{10} oder Menadion als Elektronen-Mediator zwischen NADPH und Testosteron.

Eine Solubilisierung der membrangebundenen Steroid-5 α -Reduktase ist bisher nicht gelungen (15, 32, 12), obwohl MOORE und WILSON (6) über eine neunzigfache Anreicherung einer Steroid-5 α -Reduktase durch Cäsiumchlorid-Dichte-Gradienten aus der Kernmembran von Zellen der Rattenprostrata berichten konnten. Diese Fraktion war jedoch noch erheblich mit Fremdproteinen verunreinigt.

3. Material und Methoden

=====

3.1. Material

3.1.1. Tier-Material:

Als Versuchstiere verwendeten wir pathogenfreie weibliche Wistar-Ratten (AF/Han) (160-200g). Die Tiere wurden unter den üblichen Bedingungen in klimatisierten Räumen bei 20°C in Käfigen untergebracht. Als Nahrung erhielten sie Altronin^R Standard-Diät (Fa. Altronin, Lage/Lippe) sowie Wasser ad libidum.

3.1.2. Chemikalien:

Fa. Merck, Darmstadt: Natriumhydroxid, Plätzchen, p.a.; Natriumsulfat, wasserfrei, p.a.; Natriumacetat, p.a.; tri-Kaliumphosphat-7-hydrat, p.a.; Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.; di-Kaliumhydrogenphosphat-3-hydrat, p.a.; Natriummolybdat, p.a.; Natriumwolframat, p.a.; Lithiumsulfat, p.a.; Titriplex^R III, p.a.; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, p.a.; Kieselgel H nach Stahl, p.a.; L(+)-Cysteiniumchlorid-monohydrat, p.a.; Ammoniumsulfat für biochemische Zwecke, p.a.; Salzsäure, rauchend, min 38%, p.a.; ortho-Phosphorsäure, min 85%, p.a.; 85% Schwefelsäure, p.a.; Kaliumcyanid, p.a.; Methanol für die Chromatographie; Menadion; 2,6-Dichlorophenol-indophenol-Natrium, p.a.; Aceton, p.a.; Butanol-1, p.a.; Äthanol, etwa 95%, für die Spektroskopie; Toluol, p.a.; Folin Ciocalteus Phenolreagenz; Testosteron, p.a.; 5 α -Dihydrotestosteron, p.a.; Natriumcitrat, p.a.; Lecithin aus Eiern, reinst;

Fa. Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover: Essigsäure, p.a.; Natriumdithionit, p.a. Kaliumhydroxid, p.a.;

Fa. Fluka AG, Buchs, Schweiz: 1-Thioglycerin;

Fa. Schuchardt GmbH, München: Isonicotinsäurehydrazid; 3,3-Methylenbis- (4-hydroxycoumarin); Bis-(trimethylsilyl)-acetamid, p.a.;

Fa. Serva, Heidelberg: Coenzym Q₆, rein, neutral; Isonicotinsäure-3-Na-Salz-2-hydrat; Dithioerythrit, rein;

Behringwerke AG, Marburg: Serum Albumin vom Rind;

Fa. EGA, KG, Steinheim: Pentachlorophenol, puriss.;

Fa. Boehringer, GmbH, Mannheim: NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, Rein-

heitsgrad II;

Associated Concentrates Inc., New York, USA: Asolectin (purified soya phosphatides);

Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA: Coenzym Q_{10} ;

Steroide:

Fa. Fluka AG, Buchs, Schweiz: Androstan- 3α - 17β -Diol, puriss.; Androstan- 3β - 17β -Diol, puriss.;

Fa. Merck, Darmstadt: Testosteron für biochemische Zwecke; Cholesterin für biochemische Zwecke; Androsteron für biochemische Zwecke; 5α -Dihydrotestosteron für biochemische Zwecke;

Fa. Vismara Terapeutici, Casatenovo Brianza (Como), Italien: Ätiocholanolon für wissenschaftliche Zwecke; epi-Androsteron für wissenschaftliche Zwecke; Progesteron für wissenschaftliche Zwecke;

Chemikalien für die Hemmversuche:

Fa. Merck Ag, Darmstadt: Äthylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA), p.a.; Bathocuproindisulfonsäure-dinatriumsalz (BCS), p.a.; Diäthylthiocarbaminsäure-natriumsalz (DDC), p.a.;

Bathophenanthrolindisulfonsäure-Natriumsalz (BPS), p.a.;

o-Phenanthrolin, p.a.; Amytal, p.a.; Natriumazid, p.a.;

Fa. Schuchardt GmbH, München: Triflourthienylbutandion (1-(2-Thienyl)-4,4,4-triflour-1,3-butandion) (TTA); 2-Jodacetamid; N-Äthylmaleinimid;

Fa. Riedel-de Haen, Seelze-Hannover: 8-Hydroxychinolin, p.a.; Hydroxylaminhydrochlorid, p.a.;

Fa. Hoffmann - La Roche, Basel, Schweiz: α - α -Dipyridyl

Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA: 2-Heptyl-4-Hydroxy-Chinolin-N-Oxid;

Mann Research Inc., N.Y., USA: Atebrin, 99,6% rein;

British Durg Houses Ltd., Poole, England: Rotenon, 90% rein;

Calbiochem. Corp. Los Angeles, USA: p-Chloromercuribenzoessäure-Natriumsalz (PCMB) (c grade);

Chemikalien für die Solubilisierungsversuche:

Fa. Merck AG, Darmstadt: Digitonin, krist.; Glycerin, 2x destilliert, (etwa 87%), reinst; Äthylenglycol, p.a.;

Fa. Serva, Heidelberg: Triton-X-100 (Octylphenol-decaäthylenglycoläther); Tween 20 (Laurylsorbitanpolyäthylenglycoläther);

Tween 60 (Stearylpoläthylenglycoläther); Tween 80 (Octylsorbitanpolyäthylenglycoläther);

tanpolyäthylenglycoläther);

Fa. Henkel: Eumulgin 286^R (Alkyl-arylpolyäthylenglycoläther);

Lubrol WX;

Fa. Riedel-de Haen, Seelze-Hannover: Natriumdesoxycholat für Nährböden;

Deutsche Shell Chemie GmbH: Lensodel NP 40 (nichtionogenes Kondensat aus Äthylenoxid und Octylphenol);

Fa. ICI., Frankfurt: Lubrol WX (Cirrasol) (nichtionisches Kondensat aus Cetyl-Alkohol und Polyoxyäthylenäther);

Sorptionsmittel für die Chromatographie-Verfahren:

Fa. Whatman: DEAE-Cellulose (DE 32), Kapazität 1meq/g, mikrogranular;

Fa. Machery & Nagel und Co., Düren, MN 2100 DEAE-Cellulose, Kapazität 0,7meq/g; MN 2100 CM-Cellulose, Kapazität 0,7meq/g;

Fa. Serva, Heidelberg: TEAE-Cellulose, Kapazität 0,68meq/g.

3.2. Methoden

3.2.1. Proteinbestimmung

3.2.1.1. Proteinbestimmung nach Folin Miller (46, 47)

3.2.1.1.1. Folin-Reagenz: 100g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 700ml H_2O , 50ml 85% H_3PO_4 und 100ml HCl konz. werden gemischt und 10 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Nach anschließender Zugabe von 150g Li_2SO_4 und 50ml H_2O sowie von ein paar Tropfen flüssigen Broms soll 15 Minuten lang gekocht werden, um überschüssiges Brom zu entfernen. Nachdem die Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt ist, wird sie auf einen Liter verdünnt und durch einen Glasrichter gefiltert. Die Lösung darf keinen grünen Farbton zeigen. Sie soll in einer dunklen Flasche und geschützt von allen reduzierenden Reagenzien aufbewahrt werden. Zum Gebrauch muß obige Lösung 1:11 (v/v) mit Wasser verdünnt werden.

3.2.1.1.2. Alkalisches Kupferreagenz: 0,2g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und 0,6g Tris-hydroxymethyl-aminomethan werden in 100ml H_2O dest. aufgelöst und unter Rühren zu 1000ml einer 0,5N NaOH Lösung mit 10% Na_2CO_3 gegeben. Dieses Reagenz ist ein guter Ersatz für das übliche Kupfer-Tartrat, denn es hat verbesserte Stabilität und braucht nicht täglich bereitet zu werden.

3.2.1.1.3. Protein-Standard: Kristallines Rinder-Serum Albumin wird zu einer Konzentration von 8mg/ml in Wasser gelöst. Zum Gebrauch für die FOLIN-MILLER-Methode verdünnt man diese Standard-Lösung 1:50 (v/v) mit Wasser und berechnet die Protein-Konzentration dieser Lösung mit dem bekannten Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,60$ bei 280nm (48).

3.2.1.1.4. Bestimmung der Protein-Konzentration: Zu 1ml der obigen Protein-Lösung gibt man 1ml der alkalischen Kupferlösung hinzu, mischt und läßt 10 Minuten lang stehen. Dann setzt man 3ml der verdünnten Folin-Lösung hinzu, indem der Inhalt einer 3ml Vollpipette direkt und schnell in das Reagenzglas geblasen wird, um ein rapides Mischen zu garantieren. Der letzte Rest der 3ml muß wie üblich aus der Pipette herauslaufen, um eine genaue Zugabe von 3,0ml zu erreichen. Nun werden die Reagenzgläser bei ungefähr 50°C 10 Minuten lang erhitzt, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt. Anschließend wird die Absorption in einem Photometer-Eppendorf bei 546nm gemessen.

3.2.1.2. Bestimmung der Protein-Konzentration nach der Biuret-Methode (49)

3.2.1.2.1. Biuret-Reagenz: 9g Seignette-Salz (K-Na-Tartrat) löst man in 0,2N NaOH (hergestellt aus gesättigter, abgestandener Natronlauge) auf. Anschließend werden nacheinander 3,0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und 5,0g KJ zugegeben, wobei jedes Salz vor dem Hinzufügen des nächsten gelöst sein muß. Diese Lösung wird mit 0,2N NaOH auf einen Liter aufgefüllt und in einer braunen Flasche aufbewahrt.

3.2.1.2.2. Bestimmung der Protein-Konzentration: Das Protein in den Ansätzen (der Standard enthielt Rinder-Serum Albumin) wird mit 0,15ml einer 3N Trichloressigsäure ausgefällt und anschließend in einer Labor-Zentrifuge (W. Stock, Maschinenbau, Marburg) bei 3000 Upm abzentrifugiert. Den Überstand saugt man vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe ab, löst das Sediment durch Rühren mit einem Glasstab in 5ml H_2O und fügt 5ml Biuret-Reagenz hinzu. Nachdem sich alles ausgefälltes Protein gelöst hat, läßt man die Proben 30 Minuten lang stehen und mißt anschließend die Extinktion bei 546nm in einem Photometer-Eppen-

dorf gegen einen Leerwert von 5ml H₂O und 5ml Biuret-Reagenz. Um die Trübung der Biuret-Lösung durch nicht-lösbares Mikrosomenprotein bzw. -lipide zu bestimmen, wird der blaue Kupfer-Komplex in der üblichen Weise mit Kaliumcyanid entfärbt.

3.2.1.3. Vergleich der Biuret- und der Folin-Methoden

Beim Vergleich der Standard-Eich-Kurven und bei der Bestimmung von Mikrosomenprotein ergab sich, daß die Biuret-Methode von Folin eine Abweichung der Proteinkonzentration von maximal $\pm 5\%$ zeigten.

3.2.1.4. Proteinbestimmung nach WARBURG (50)

Bei den DEAE-Cellulose-Verfahren kam es oft darauf an, Proteinfractionen schnell zu finden. Dazu verwendeten wir die spektralphotometrische Proteinbestimmungsmethode nach WARBURG bei 260 und 280nm im Zeiss-Spektrophotometer. Die Grundabsorption der Detergenzien bei 260 und 280nm störte die Bestimmung beträchtlich und wurde deswegen nur zum Auffinden von Proteinpeaks verwendet.

3.2.2. Gewinnung von Rattenleber-Mikrosomen

Zur Gewinnung von Rattenleber-Mikrosomen benutzten wir die Methode von SCHNEIDER und HOGEBOOM (51) in einer modifizierten Form. Nach dem Dekapitieren der Ratten nahmen wir die Leber sofort heraus und legten sie bis zum Wiegen auf Eis. Im Durchschnitt konnten wir 7g Leber-Frischgewicht pro Ratte (Wistar, 160-200g, 60-120 Tage alt) messen. Durch Waschen des Lebergewebes in eiskalter 0,25M Sucrose-Lösung wurde Hämoglobin entfernt. Zum Homogenisieren des Lebergewebes fügten wir das neunfache Volumen einer 0,25M Sucrose-Lösung, bezogen auf das Leber-Frischgewicht, hinzu und homogenisierten 30 Sekunden lang mit dem Ultra Turrax (Typ TD 18/2, Janke & Kunkel KG, Staufen, i. Br.). Ein weiteres Zerkleinern der Mikrosomenpartikel wurde durch Suspenderen mit dem Potter Elvehjem erreicht. Die Mitochondrien und Kerne entfernten wir durch Zentrifugieren der Mikrosomen-Suspension bei 10 000xg (15min). Der Überstand wurde anschließend eine Stunde lang bei 105 000xg in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, der dabei erhaltene Überstand abgeschüttet und das Se-

diment mit 3ml/g Leber-Frischgewicht eines 0,01M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 aufgenommen. Zum vollständigen Entfernen von löslichen Proteinen wurden die Mikrosomen zweimal mit 0,01M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 gewaschen (105 000xg Zentrifugation, Aufnehmen des Sedimentes wie oben beschrieben und anschließend erneute Zentrifugation bei 105 000xg, 1 Stunde lang). Zum Schluß suspendierten wir die Mikrosomen zu einer Konzentration von 30mg/ml in 0,01M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 und bewahrten sie in 10ml-Fraktionen in der Tiefkühltruhe auf.

In diesem Zustand ist die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität monatelang haltbar (getestet 6 Monate), während in 0,02M Tris-HCl pH 7,0 eingefrorene Mikrosomen schon nach 10 Tagen keine NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität mehr aufweisen. Zur weiteren Verwendung wurden die Mikrosomen mit warmem Wasser schnell aufgetaut. Für den optischen Test der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase mußte die Mikrosomensuspension 1:5 (v/v) mit Kaliumphosphat-Puffer verdünnt werden, um eine lineare Abhängigkeit der Aktivität von dem Proteingehalt messen zu können.

3.2.3. Enzymatische Tests

3.2.3.1. Der optische Test für die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase

Die Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität wird im optischen Test durch die Abnahme des eingesetzten NADPH bei 366nm im Photometer-Eppendorf gemessen. Das Ansatzvolumen beträgt 1ml in plangeschliffenen Glasküvetten bei 37°C. Folgende Endkonzentrationen werden eingesetzt: 0,1mM Testosteron, 0,4mM NADPH, 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 und gewöhnlich 0,3mg Protein/ml. Die Oxidation des NADPH bleibt linear bis zu einer Proteinkonzentration von 0,8mg/ml. Den optischen Test führt man durch, indem man den Puffer, das NADPH und Testosteron etwa fünf Minuten in der Küvette bei 37°C vorinkubiert und dann das Mikrosomenprotein mit einem Rührstab hinzufügt. Von diesem Moment an wird die Extinktion fünf Minuten lang mit einem Eppendorf-Linear Schreiber (1cm/min, Bereich 0,0-0,5) gemessen. Gewöhnlich geht der NADPH-Verbrauch nach etwa einer Minute in den linearen Bereich über, wenn endogene Substrate verbraucht sind. Zur Auswertung nahmen wir den

linearen Bereich der Kurve.

Bei jeder Aktivitätsmessung muß der sogenannte "Leerschleich" bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird anstelle des Testosterons lediglich die entsprechende Menge Äthanol, in dem das Testosteron gelöst war, eingesetzt. Zu der Bestimmung der Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität ziehen wir den Leerschleich von der Aktivität in Gegenwart von Testosteron ab (12).

3.2.3.2. Das Messen der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität durch die Isonicotinsäurehydrazid (INH)-Reaktion

Dieser Nachweis beruht auf einer Farbreaktion, die Testosteron mit Isonicotinsäurehydrazid gibt. Auf diese Weise kann auf Grund der Abnahme der Testosteron-Konzentration die Aktivität der Steroid-5 α -Reduktion bestimmt werden (52).

3.2.3.2.1. Das Aufstellen einer Standard-Kurve: Man pipettiert 0,01-0,1ml einer 2,5mM alkoholischen Testosteron-Lösung in Spitzröhrchen und verdampft den Alkohol am Rotationsverdampfer. Zu den Proben fügen wir dann 0,5ml der Lösung I hinzu (0,625ml HCl konz. in 1 Liter frisch destill. absol. Alkohols). Nachdem sich das Steroid gelöst hat, setzen wir 0,5ml der Lösung II (20mg Isonicotinsäurehydrazid in 50ml der Lösung I gelöst) zu und inkubieren anschließend die gut verschlossenen Röhrchen 1 Stunde lang im Wasserbad bei 25°C. Die Extinktion wird im Photometer-Eppendorf bei 366nm gegen einen Leerwert, der kein Testosteron enthält, gemessen. Aus der Standard-Kurve ergibt sich die Relation Extinktion x 0,25 = mmole Testosteron.

3.2.3.2.2. Inkubation der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase und Extraktion der Steroide: Hierzu wurden wie unter 3.2.3.1. beschrieben, 3ml gesamtes Inkubationsmedium 5-30 Minuten lang in 15ml fassenden Schliffröhrchen inkubiert. Wir unterbrechen die Reaktion durch Zugabe von 1ml 5N NaOH und extrahierten dann die Steroide mit 4 x 10ml Äther. Die oberen Phasen wurden in einem Rundkolben gesammelt, der Äther am Rotationsverdampfer **eingedampft** und der Rückstand dann in kleine Spitzröhrchen überführt. Mit diesen Proben führten wir dann die Isonicotinsäure-

hydrazid-Reaktion durch. In einem Testexperiment wurde gezeigt, daß 90-95% des eingesetzten Testosterons durch Extraktion und die INH-Reaktion wiedergefunden werden.

3.2.3.3. Das Messen der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität durch gaschromatographische Bestimmung der Steroide

Dieser Nachweis der Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität beruht darauf, daß die in dem Ätherextrakt der Ansätze enthaltenen Produkte und Substrate der Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktase gaschromatographisch bestimmt werden. Wir benutzten die Gas-Chromatographen von Varian Modell 1520 und Beckmann Modell GC-M mit einer Säulenlänge von jeweils 100 bis 180cm. Das Säulenmaterial bestand durchweg aus Glas. Die Säulentemperatur wurde auf 195-228°C, die des Detektors auf 250°C und die des Injektors auf 250°C eingestellt. Die Durchflußgeschwindigkeit der synthetischen Luft lag bei 200ml/min, die des Wasserstoffs bei 20ml/min. Das Trägergas (N₂) wurde auf 27ml/min eingestellt. Als stationäre Phase wurden die Materialien XE-60 (Serva, Heidelberg) und OV-17 (Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 3% verwendet. Zum Belegen der Säule lösten wir 150mg XE-60 oder OV-17 in etwa 100ml Aceton. 5g Chromosorb^R W/AW-DMCS (Schuchardt, München) wurden hinzugefügt und anschließend das Chromosorb unter ständigem Schütteln im Vakuum bei 40-50°C von dem Aceton befreit, wodurch ein gleichmäßiges Verteilen des Säulenbelages (OV-17 oder XE-60) auf die Chromosorbpartikel garantiert werden kann. Vor dem Packen der Glassäule wurde diese innen mit etwas Trimethylchlorsilan benetzt. Mit Hilfe eines Vibrators und einer Wasserstrahlpumpe wurden dann die Chromosorbpartikel gleichmäßig in die Säule hineingezogen, die Säule in den Gas-Chromatographen eingespannt und vor dem Beginn jeder Trennung der Steroide 24 Stunden bei den oben angegebenen Temperaturen vorgeheizt.

3.2.3.3.1. Bestimmung des Faktors: Zum Bestimmen der Faktoren gaben wir genau ausgewogene Mengen (0,2-1,0mg) der Steroide Testosteron, 5 α -Dihydrotestosteron, 3 β -17 β -Androstandiol, 3 α -17 β -Androstandiol und Cholesterin als innerer Standard in Spitzröhrchen. Nach Zugabe von 0,1ml Bis-(trimethylsilyl)-acetamid

pro Probe wurden die Röhrchen eine Stunde bei 65°C inkubiert. Nach vollständig abgelaufener Reaktion dampften wir das Silylierungsreagenz im N₂-Strom ab und lösten den Rückstand in 0,1ml trockenem Aceton auf. Die in den Gas-Chromatographen injizierte Menge von 1µl enthält auf diese Weise von jedem Steroid 2-10µg. Unter Beachtung der an dem Gas-Chromatographen eingestellten Empfindlichkeit (in der Regel $16-512 \times 10^{-11}$) ergibt sich der Faktor als µg/Fläche unter dem von dem Linearschreiber registriertem Peak. Die Peakfläche errechneten wir durch Multiplikation der Halbwertsbreite mit der Höhe des Peaks.

Die Retentionszeiten der Steroid-Silyläther waren nicht immer konstant, z.T. von Tag zu Tag verschieden. Aus diesem Grunde wurde vor jeder Versuchsserie eine Mischung der Silyläther bekannter Steroide eingespritzt, so daß die Retentionszeiten der unbekannten Steroide genau verglichen werden konnten.

3.2.3.3.2. Gaschromatographische Trennung der Produkte der NADPH:Δ⁴-3-Ketosteroid-Oxidoreduktion: Das Substrat Testosteron wurde in der beschriebenen Weise mit Mikrosomen inkubiert und die daraus entstandenen Produkte der Steroid-5α-Reduktase extrahiert wie unter 3.2.3.2.2. beschrieben. Nach dem Silylieren nahmen wir den Verdampfungsrückstand in 0,1ml trockenem Aceton auf und spritzten 1 µl dieser Lösung in den Gas-Chromatographen ein. Cholesterin (80ug) wurde als innerer Standard nach dem Extrahieren, aber vor dem Silylieren hinzugefügt. Eine optimale Peak-Höhe konnte bei obigem Ansatz mit der Empfindlichkeit 16×10^{-11} erreicht werden.

3.2.3.4. Messung der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase im optischen Test

Die Aktivität der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase wurde im optischen Test durch die Abnahme der Absorption bei 366nm im Photometer-Eppendorf gemessen. In einem Gesamtvolumen von 1ml eines 0,2M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 enthielt der Enzymanatz 0,4mM NADPH, 0,042mM Cytochrom c und die Menge an Mikrosomenprotein, die eine Extinktionsabnahme von etwa 0,1 pro Minute ergibt. Bei einer Mikrosomenpräparation, die 30mg/ml Protein

enthält, muß man dazu etwa 0,07-0,08mg Protein einsetzen. Die Reaktion setzten wir durch Zugabe des Cytochroms c mit Hilfe eines Rührstabes in Gang.

3.2.3.5. Messung der NADPH: Vitamin K₃-Oxidoreduktase-Aktivität im optischen Test

Die Reduktion des Vitamin K₃ (Menadion) mit Hilfe von NADPH wurde im optischen Test durch die Abnahme der Extinktion bei 366nm im Photometer-Eppendorf gemessen. In einem Gesamtvolumen von 1ml eines 0,2M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 enthielt der Enzymsatz 0,4mM NADPH, bis 0,1mM Menadion (in Äthanol) oder Menadionbisulfit (in H₂O) sowie die Menge an Protein, die pro Minute eine Extinktionsabnahme von höchstens 0,1 ergibt. Original-Mikrosomen mit einer Protein-Konzentration von 30mg/ml mußten dazu etwa 1:40 verdünnt werden. Die Reaktion starteten wir durch Zugabe des Vitamins K₃.

3.2.3.6. Messung der NADPH: DCPIP-Oxidoreduktase-Aktivität im optischen Test

Die Reduktion des Dichlorophenol-Indophenols (DCPIP) im optischen Test wurde durch die Abnahme der Extinktion bei 366nm oder 578nm im Photometer-Eppendorf gemessen. In einem Gesamtvolumen von 1,0ml eines 0,2M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 enthielt der Enzymsatz 0,4mM NADPH, bis zu 0,1mM DCPIP (in Äthanol) sowie die Menge an Protein, die pro Minute eine Extinktionsveränderung von maximal 0,12 hervorruft. Dazu mußten z.B. Original-Mikrosomen, die 30mg Protein pro ml enthielten, mindestens 1:40 verdünnt werden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der DCPIP-Lösung gestartet.

3.2.4. Zwei-Substrate-Kinetik

Die Zwei-Substrate-Kinetik wurde zur Klärung der Frage, ob die NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase bei dem Elektronentransport von NADPH auf Testosteron beteiligt ist, angewendet. Das Prinzip dieser Kinetik beruht darauf (53), daß in einer enzymatischen Reaktion aus zwei möglichen Substraten (eines davon muß schnell, das andere langsamer umgesetzt werden) die Gesamtreaktion meßbar sein muß. In dem Michaelis-Menten-Plot bzw. dem Lineweaver-

-Burk-Plot ergibt sich dann ein charakteristischer Schnittpunkt der beiden Kurven, wenn man Gesamtreaktion gegen ansteigende Konzentrationen einmal des schnelleren Substrates allein, dann des schnelleren Substrates in Gegenwart einer konstanten Konzentration des langsameren Substrates aufträgt.

In unseren Experimenten verwendeten wir als langsam umgesetztes Substrat Testosteron (0,1mM) und als schnell umgesetzte Substrate bis zu 0,1mM Menadion, bis zu 0,2mM Cytochrom c und bis zu 0,1mM DCPIP. Die Reaktion wurde als eine Funktion der Extinktionsabnahme bei 366nm in Gegenwart von NADPH im Photometer-Eppendorf gemessen. Die Versuchsbedingungen sind unter 3.2.3.1. beschrieben.

3.2.5. Solubilisieren der NADPH: Steroid- Δ^4 -3-Keto-Oxidoreduktase

3.2.5.1. Durch Beschallen

Das Beschallen wurde mit einem Branson Sonic Power Sonifier Ultraschallgerät durchgeführt. Bei Benutzung der Mikrospritze (7ml Volumen) verwendeten wir eine Kühltemperatur von -12°C bis -18°C . Dabei war der Tuner auf Position 5 gestellt. Die Beschallungszeit betrug 5-10 Minuten. Mußte das Volumen von mehr als 7ml beschallt werden, so stellten wir Tuning auf Position 8 und hielten die Kühltemperatur auf -18°C . Die Temperatur der Suspension wurde während des Beschallens laufend überprüft und stieg nicht über 10°C .

3.2.5.2. Durch Butanol-Extraktion (54)

Wir mischten eine Mikrosomen-Suspension (30mg Protein/ml) mit eiskaltem n-Butanol im Volumenverhältnis 2:1 und äquilibrierten diese Mischung 30 Minuten lang bei 0°C . Nach anschließender Zentrifugation (27 000xg, 1/2 Stunde) wurde die obere aus Butanol bestehende Schicht vorsichtig abgenommen, die untere, mit Butanol gesättigte wäßrige Schicht von der mittleren, aus unlöslichen Proteinen und Lipiden bestehende Schicht abgetrennt. Wir resuspendierten die unlösliche Fraktion in dem gleichen Volumen eines 0,01M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 wie zur Solubilisierung der Mikrosomen eingesetzt worden waren und untersuchten

alle drei Fraktionen allein und nach Rekombination auf NADPH:
 Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität.

3.2.5.3. Durch Aceton-Extraktion (55)

Wir führten alle Experimente bei -18°C durch. 3ml einer Mikrosomensuspension, die 30mg Protein pro ml enthielt, wurden mit 72ml einer auf -18°C vorgekühlten Lösung vermischt, die 67,5ml trockenes Aceton und 4,5ml H_2O enthielt. Diese Mischung schüttelten wir vorsichtig 10 Minuten lang bei -18°C und zentrifugierten sie anschließend bei 10 000xg (1-2min). Den Überstand konnte man verwerfen; das Sediment mußte schnell in 3ml des 0,01M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 durch Pottern resuspendiert werden. Bis zu diesem Zeitpunkt durften nicht mehr als 20min vergangen sein. Nach erneuter Zentrifugation (27 000xg, 10min) trennten wir den Überstand vom Sediment ab, resuspendierten dieses in 3ml des 0,01M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 und untersuchten beide Fraktionen sowohl allein als auch in Kombination auf NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität.

3.2.5.4. Durch Detergenzien

Zum Solubilisieren der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase lösten bzw. suspendierten wir 5g oder 5ml der Detergenzien in 4,5ml H_2O dest. und äquilibrierten diese Lösung bzw. Suspension mit 3,5ml einer Mikrosomen-Suspension, die 30mg Protein/ml enthielt, 30 Minuten lang auf dem Magnetrührer bei 0°C . Die anschließend stattfindende Zentrifugation bei 105 000xg (60min) trennte die unlöslichen Proteine ab. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, das Sediment in 3,5ml des Kaliumphosphat-Puffers aufgenommen. In einigen Experimenten setzten wir zum Solubilisieren zusätzlich unterschiedliche Mengen von Glycerin (20-50%), KCl (bis 0,1M), Natriumzitrat (bis 0,1M), EDTA (bis 0,01M) und Thioglycerin (10%) hinzu. Alle Fraktionen wurden auf Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität überprüft.

3.2.6. Chromatographie an Ionenaustauscher-Säulen

Es wurden nur Ionenaustauscher-Materialien von Whatman (DE 32), Serva (TEAE-Cellulose) und Machery & Nagel (CM- und DEAE-Cellulose) benutzt. Vor jedem Gebrauch cyclisierten wir die Austauscher-

Cellulose nach den Angaben der Whatman-Vorschrift in 0,5N HCl und 0,5N NaOH. Vor dem Packen der Säule wurde die Austauschercellulose mit H_2O dest. bis zum neutralen pH gewaschen und anschließend mit der Säuren- bzw. der Basenkomponente des 0,01M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 auf den gewünschten pH titriert. Die Säulen bestanden durchweg aus Glas. Ein gleichmäßiges Packen der Säulen erreichten wir, indem mit Hilfe einer Auftragkugel das gesamte für die Trennung vorgesehene Austauscher-Material in einer Portion in die Säule hineinströmte und sich durch die Schwerkraft absetzte. Ein Waschen der jetzt gepackten Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen eines 0,01M Kaliumphosphat-Puffers mit dem gewünschten pH-Wert garantierte ein genaues Einstellen der Wasserstoffionen-Konzentration in der Säule. Zum Äquilibrieren verwendeten wir das zweifache Säulenvolumen eines Puffers, der alle Komponenten, die auch zum Solubilisieren benutzt wurden, enthielt. Mit Hilfe einer Pipette konnte dann die solubilisierete Enzymlösung auf die Säule aufgetragen werden. Es schloß sich ein Nachwaschen der Ionenaustauscher-Cellulose mit Solubilisierungspuffer an (gewöhnlich ein Säulenvolumen). Die Elution der an dem Ionenaustauscher adsorbierten Proteine erreichten wir durch Anwendung eines Gradienten (0,01M-1M KCl) oder einer Salzlösung mit konstanter Konzentration (1M KCl). Die Elutionsflüssigkeit enthielt im übrigen die gleiche Zusammensetzung wie der Solubilisierungspuffer. Bei Verwendung des Salz-Gradienten benutzen wir eine Schlauchpumpe (Heidolph Elektro KG, Kelheim) sowie einem im Biochemischen Institut Giessen angefertigten Gradientenmischer. Alle Operationen wurden in der Kühlzelle bei $4^{\circ}C$ durchgeführt.

3.2.7. Fraktionieren von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Zum Fraktionieren mit Ammoniumsulfat wurden nur solubilisierete Mikrosomen-Präparationen benutzt. Dabei verwendeten wir festes $(NH_4)_2SO_4$. Die eingesetzten Mengen an $(NH_4)_2SO_4$ errechneten sich nach (56). Die Zugabe des festen Ammoniumsulfates verteilten wir gleichmäßig auf einen Zeitraum von 15 Minuten, anschließend wurde die Lösung auf dem Magnetrührer 30 Minuten äquilibriert. Nach einer Zentrifugation bei 10 000xg (20min) trennten wir Flotat und klare Lösung; letztere wurde mit einer nun höheren

Ammoniumsulfat-Konzentration gesättigt und wie oben beschrieben äquilibriert und zentrifugiert. Die beiden erhaltenen Flotate lösten wir in dem gleichen Volumen des Solubilisierungs-Puffers auf, welches am Anfang eingesetzt worden war. Alle Fraktionen wurden auf die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-, NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase-, NADPH: Vitamin K₃-Oxidoreduktase-, NADPH: DCCIP-Oxidoreduktase-Aktivitäten untersucht.

3.2.8. Stabilität der solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase unter Ausschluß von Sauerstoff

Nach Solubilisieren und Zentrifugieren (3.2.5.4.) der Mikrosomen verdünnten wir den daraus erhaltenen Überstand mit dem vierfachen Volumen eines 0,01M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0, der vorher im Vakuum von Sauerstoff befreit worden war. Nach Messen der Ausgangsaktivität befreiten wir diese verdünnte Lösung unter Rühren mit einem Magnetrührer im Vakuum erneut von Sauerstoff, bis keine Luftblasen mehr aufstiegen. Die experimentelle Anordnung ist in Abb. 1 wiedergegeben. Mit Hilfe einer Injektions-spritze konnte dann 1/60 des obigen Volumens einer Dithionit-Lösung, die 6mg Dithionit/ml enthielt, durch den Schlauch hindurch in die Enzymlösung eingeführt werden, um den Rest des nicht durch die Wasserstrahlpumpe evakuierten Sauerstoffs zu reduzieren. Anschließend wurde der Erlenmeyerkolben mit Argon aus einer Fußballblase gefüllt, um zu garantieren, daß auch bei längerem Aufbewahren bei 4°C kein neuer Sauerstoff mit der Enzymlösung in Berührung kommen konnte. Von Zeit zu Zeit wurden mit einer langen Spritze durch den Gummistopfen hindurch Proben aus der enzymatischen Lösung entnommen, um die Aktivität zu messen.

Im Kontrollversuch evakuierten wir die solubilisierten Mikrosomen ebenfalls, um vergleichbare Werte zu erhalten. Beim Evakuieren entsteht in der verdünnten Lösung, infolge der Gegenwart von Glycerin und Detergenzien, Schaum, wodurch die enzymatische Aktivität teilweise abnahm. Die Aufbewahrung der Kontrollproben erfolgte dann jedoch in offenen Behältern, um nachträgliche O₂-Sättigung zu erreichen. Die Kontrollproben enthielten kein Dithionit, und die Steroid-5 α -Reduktase-Aktivitäten wurden nicht

auf Dithionit-Hemmung korrigiert.

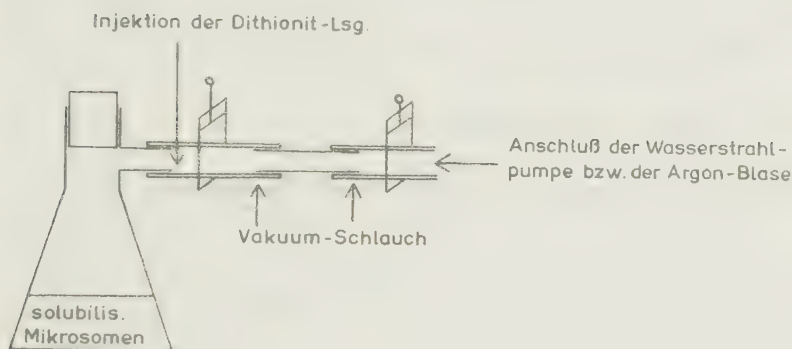


Abb. 1a: Vorrichtung zur Entfernung des Luftsauerstoffs aus einer Mikrosomensuspension (3.2.8.).

3.2.9. Statistik

Alle Werte, die als Resultate in dieser Arbeit angegeben sind, repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens vier Versuchen unter gleichen Bedingungen. Im Falle der Zwei-Substrate-Kinetik verwendeten wir zur besseren Signifikanzberechnung 8-16 Werte. Soweit die Standardabweichung angegeben ist, errechnet sich diese aus der Formel:

$$\sigma = \sqrt{\frac{d^2}{N - 1}}$$

d = gemessene Werte, N = Anzahl der Messungen

Die Signifikanzberechnung führten wir mit dem t-Test durch. Bei einem Vergleich zweier Mittelwerte, die aus der gleichen Anzahl von Messungen errechnet werden, ist die entsprechende Formel:

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{N (N - 1)}}}$$

$$\bar{d} = \bar{x}_1 - \bar{x}_2, \quad d_1 = x_{11} - x_{21}, \quad d_2 = x_{12} - x_{22}$$

N = Anzahl der Messungen.

Die Signifikanz-Grenze wurde mit 5% angenommen.

4. Resultate

=====

4.1. Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit

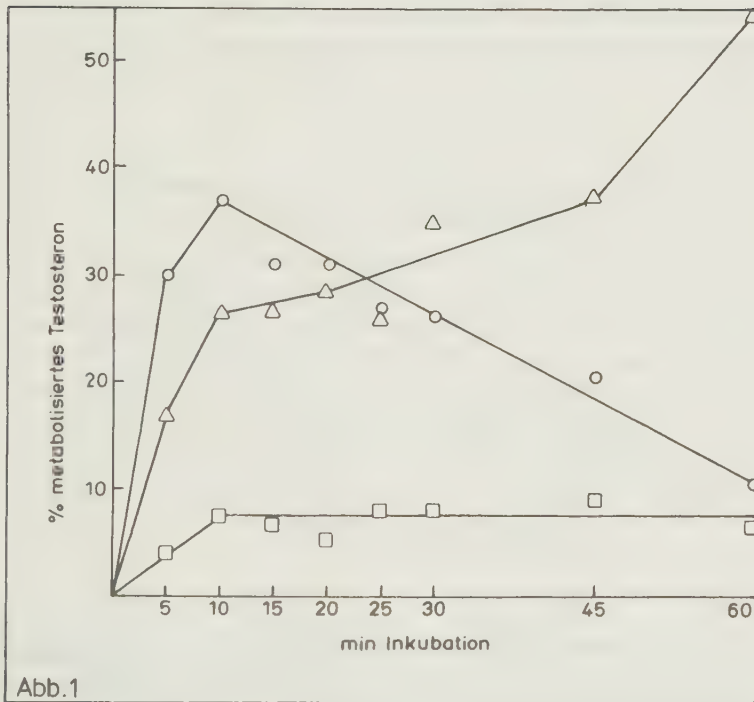
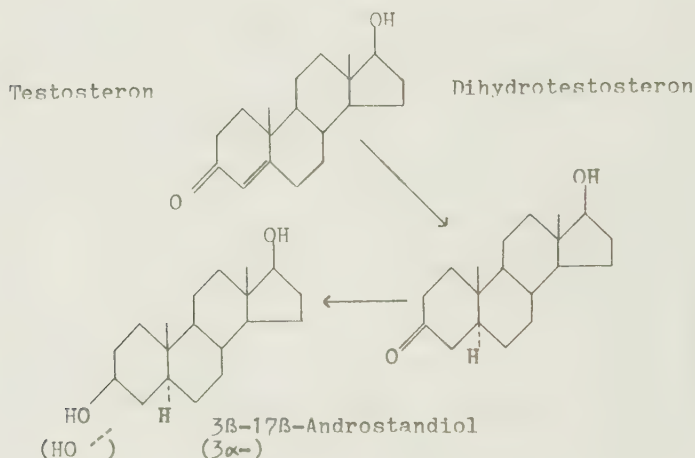


Abb. 1: Zeit-abhängige Produkt-Bildung mit Testosteron als Substrat. Das Inkubationsmedium enthielt in 3ml 0,4mM NADPH, 0,1mM Testosteron, 1,5mg Mikrosomen-Protein, 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0. Die Bestimmung der Steroide erfolgte gaschromatographisch. ○—○ 3β-17β-Androstadiol, □—□ 3α-17β-Androstadiol, Δ—Δ Dihydrotestosteron.

Die Reduktion von Testosteron zu Dihydrotestosteron, 3α-17β-Androstadiol und 3β-17β-Androstadiol soll in der Reihenfolge Testosteron → Dihydrotestosteron → Androstadiol ablaufen (37, 41, 42).

Die Daten in der Literatur sind darüber jedoch nicht einheitlich, besonders bezüglich der Bildung der beiden Androstandiole (siehe Einleitung). Eine Untersuchung über die Zeit-abhängige Entstehung der beiden Androstandiol-Steroide ist besonders im Hinblick auf kinetische Experimente, bei welchen quantitative Berechnungen durchgeführt werden müssen, angebracht.



Aus der Abb. 1 ersehen wir, daß in unseren Mikrosomen-Präparationen sowohl Dihydrotestosteron als auch 3α -17 β -Androstadiol und 3 β -17 β -Androstadiol gebildet werden. Die Kurven in Abb. 1 repräsentieren die Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktion einer charakteristischen Mikrosomen-Präparation; das Ausmaß der Reduktion von Testosteron zu den verschiedenen Steroiden variiert mit anderen Mikrosomen-Aufbereitungen. Während die Bildung von 3 β -17 β -Androstadiol prozentual immer am höchsten lag (aus 30-50% des eingesetzten Testosterons), wurden bezüglich der Bildung von Dihydrotestosteron und 3α -17 β -Androstadiol unterschiedliche Aktivitäten gemessen, die in gegenseitiger Abhängigkeit standen. Bei hohem Anteil von 3α -17 β -Androstadiol (z.B. 40%) liegen die Konzentrationen von entstandenem Dihydrotestosteron sehr niedrig (weniger als 10%). In der Abb. 1 ist der Fall wiedergegeben, bei dem bei niedriger 3α -17 β -Androstadiol-Bildung höhere Anteile von Dihydrotestosteron gefunden werden. Charakteristisch ist weiter-

hin, daß bei längerer Inkubation (mehr als 30min) die Konzentration von 3β - 17β -Androstandiol ab- und gleichzeitig die Menge an gefundenem Dihydrotestosteron zunimmt. Diese Zunahme von Dihydrotestosteron bei parallel laufender Abnahme von 3β - 17β -Androstandiol ist weniger oder nicht signifikant, wenn die gefundenen Konzentrationen des Dihydrotestosterons niedrig lagen. Eine ähnliche Korrelation mit 3α - 17β -Androstandiol und Dihydrotestosteron konnten wir nicht beobachten.

4.2. Über die Reduktion von Testosteron zu Dihydrotestosteron und 3α - 17β - sowie 3β - 17β -Androstandiol

Wir testeten Original-Mikrosomen auf ihre Fähigkeit, die oben genannten Steroide zu bilden. Es sollte untersucht werden, ob die beiden Androstandiol-Steroide aus Testosteron obligatorisch über Dihydrotestosteron entstehen. Dazu verwendeten wir die Rückreaktion von Androstandiol zu Dihydrotestosteron mit NADP^+ bzw. NAD^+ als Coenzym. Die Methoden sind unter 3.2.3.3. beschrieben (30min Inkubation, 0,4mM $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$, 0,1mM Steroid, 4,5mg Mikrosomen-Protein, 0,1M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0).

Tabelle 1:

eingesetzte Substrate	entstandene	Produkte
	mit NADP^+	mit NAD^+
3α - 17β -Androstandiol	3β - 17β -Androstandiol (+)	3β - 17β -Androstandiol (+)
	Dihydrotestosteron (8,5%)	5α -Androstan- 3α -ol- 17 -on (10,5%)
3β - 17β -Androstandiol	3α - 17β -Androstandiol (+)	3α -Androstandiol (+)
		5α -Androstan- 3α -ol- 17 -on (+)

(+) = Spur

Tabelle 1 gibt über die Ergebnisse Auskunft. Mit NADP^+ als Coenzym entsteht Dihydrotestosteron (8,5%) aus 3α - 17β -Androstandiol, nicht aber aus 3β - 17β -Androstandiol. Setzen wir NAD^+ als Wasserstoffakzeptor ein, so wird Dihydrotestosteron zu 2% aus 3α - 17β -Androstandiol gebildet. 3β - 17β -Androstandiol bleibt

wiederum unwirksam.

Vermutlich auf Grund der Aktivität einer Epimerase (8) wird bei Einsatz der Androstandiol-Derivate als Substrate jedesmal ein wenig (+) des anderen Androstandiol gebildet. Dabei spielt die Art des Coenzyms keine Rolle.

5 α -Androstan-3 α -ol-17-on, ein Steroid, welches sich von 3 α -17 β -Androstandiol nur durch das Vorkommen einer 17-Keto-Gruppe anstelle einer 17-OH-Gruppe unterscheidet, entsteht vorzugsweise aus 3 α -17 β -Androstandiol in Gegenwart von NAD⁺.

4.3. Die Abhängigkeit der NADPH-Oxidation im optischen Test von der Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität

Die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase wurde bislang oft durch den optischen Test gemessen (12), in dem die Abnahme des eingesetzten NADPH bei 366nm oder 340nm gemessen und mit der Reduktion der Steroide gleichgesetzt wird.

In unseren Untersuchungen bestimmten wir die Produkte der mikrosomalen Testosteron-Reduktion mit Hilfe der Gas-Chromatographie. Dabei fanden wir die Steroide Dihydrotestosteron, 3 α -17 β -Androstandiol, 3 β -17 β -Androstandiol, 3 α -5 α -Androsteron sowie eine größere Anzahl von weiteren Steroiden, vermutlich hydroxylierte Testosteron-Derivate, die wir nicht näher charakterisierten. Aus diesen Angaben wird klar, daß die NADPH-Abnahme im optischen Test nicht vollständig mit der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität korreliert werden kann. Eine Untersuchung darüber, wieviel der NADPH-Oxidation auf die Steroid-5 α -Reduktion entfällt, ergab folgendes:

Die gaschromatographische Bestimmung der nicht-metabolisierten Mengen an Testosteron und der aus dem Testosteron entstandenen Produkte ergaben folgendes: Tabelle S. 27

In der Spalte IV ist die Menge an Testosteron wiedergegeben, die an der Δ^4 -3-Keto-Position reduziert wurde. Alle Testosteron-Moleküle, die z.B. an den Positionen 6, 7 oder 11 hydroxyliert oder an 17 oxidiert wurden, können durch die INH-Reaktion, die

Tabelle 2

Testosteron eingesetzt (μg)	3α - 17β -Andro- standiol (μg)	3β - 17β -Andro- standiol (μg)	Dihydro- testosteron (μg)	5α -Androstan- 17-on (μg)	Rest-Testoste- ron (μg)
73	7,3	5,9	38,4	0,7	0

Daraus berechnen wir die Spalten I, II, III, IV			
I	II	III	IV
μg Testosteron reduziert, be- rechnet durch den optischen Test	Summe in μg der Steroide Dihydrotestosteron 3β - 17β -Androstandiol 3α - 17β -Androstandiol 3α - 5α -Androsteron, be- stimmt durch Gas-Chrom.	μg Testosteron metabolisiert, bestimmt durch Gas-Chromato- graphie	μg Testosteron reduziert an der Δ^4 - 3 -Keto-Position, bestimmt durch INH-Test
93,4	52,3	73,0	58,0

Versuchs-Bedingungen: 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 0,4mM NADPH, 0,1mM Testosteron ($73\mu\text{g}$),
0,3mg Mikrosomen-Protein, Volumen 3,0ml, 10min Inkubation.

ja spezifisch für eine Δ^4 -3-Keto-Gruppierung ist (52), von einem nicht-metabolisierten Testosteron-Molekül nicht unterschieden werden. Wir fanden auf diese Weise, daß 58 μ g Testosteron reduziert wurden, d.h. 80% des eingesetzten Testosterons wurden an der Δ^4 -3-Keto-Position hydrogeniert.

In der Spalte III ist die Menge an Testosteron wiedergegeben, die in irgendeiner Weise verändert worden ist und im Gas-Chromatographen von Testosteron getrennt wird. Dies kann eine Reduktion an der Δ^4 -3-Keto-Position sein, aber auch eine Hydroxylierung an jeder anderen Position oder eine Oxidation am Kohlenstoffatom 17. Es stellte sich heraus, daß alles eingesetzte Testosteron auf irgendeine Weise metabolisiert wurde, denn im Gas-Chromatographen konnte kein Testosteron nachgewiesen werden.

In der Spalte II haben wir die Summe in μ g der Steroide Dihydrotestosteron, 3α -17 β -Androstadiol, 3β -17 β -Androstadiol und 3α -5 α -Androsteron angegeben. Die Bestimmung erfolgte durch Gas-Chromatographie. Die errechnete Summe von 52,3 μ g entspricht einer Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktion von 72%.

In der Spalte I haben wir die Menge an Testosteron angegeben, die sich aus dem gemessenen NADPH-Verbrauch errechnet. Dabei reduziert ein Molekül NADPH ein Molekül Testosteron. Die berechnete Menge von 93,4 μ g Testosteron liegt um 27% höher als überhaupt an Testosteron eingesetzt wurde.

Berechnen wir den NADPH-Verbrauch durch Rück-Kalkulation mit den im Gas-Chromatographen bestimmten Steroiden, wobei zu berücksichtigen ist, daß für die Bildung von einem Molekül Dihydrotestosteron ein NADPH, für ein Molekül Androstadiol zwei NADPH und für die Bildung von einem Molekül 3α -5 α -Androsteron 1 1/2 NADPH verbraucht wurden, so kommen wir auf einen NADPH-Verbrauch, der der Reduktion von 69,5 μ g Testosteron entspricht (1 NADPH/1 Testosteron). Dies bedeutet, daß nur 72,5% des NADPH-Verbrauchs auf die Aktivität der Steroid-5 α -Reduktase zurückzuführen sind.

Daraus ziehen wir den Schluß, daß der optische Test nur für wenige Fälle, etwa das schnelle Auffinden von Steroid-5 α -Reduktase-

Fraktion bei der DEAE-Cellulose-Chromatographie, verwendet werden sollte. Quantitative Aussagen und Angaben über die Relation der entstandenen Steroide Dihydrotestosteron und Androstandiol können mit dem optischen Test nicht gemacht werden.

4.4. Hemmstoffversuche

Hemmstoffversuche und die Verwendung spektralphotometrischer Methoden haben die Möglichkeit eröffnet, Reaktionen, die mittels mehrerer hintereinandergeschalteter Enzyme ablaufen, an verschiedenen Punkten unterbrechen und dadurch die Sequenz der Enzyme und die Art der Interaktion zu untersuchen (57). Die exakte Natur der Rezeptor-Seite konnte in vielen Fällen bisher noch nicht aufgeklärt werden. Im allgemeinen scheint ein gewisser Grad an struktureller Integrität des Komplexes für die Interaktion mit dem Inhibitor vorhanden sein zu müssen, da lösliche, phospholipidfreie Enzyme die charakteristischen Hemmungseigenschaften nicht zeigen (58).

Die Hemmung membrangebundener Enzymkomplexe kann durch Substanzen erreicht werden, die entweder als kompetitive und irreversible Enzyminhibitoren agieren, oder die das Substrat daran hindern, an die aktive Seite des Enzyms zu gelangen (59). Äthylmorphin und Hexobarbital werden durch mischfunktionelle Oxygenierung in den Lebermikrosomen inaktiviert (60). Gewisse Steroide, z. B. Testosteron, Androsteron, Progesteron, Hydrocortison werden durch das gleiche Enzymsystem durch Hydroxylierung inaktiviert (61). Die oben genannten Steroide treten mit Äthylmorphin und Hexobarbital in Konkurrenz um die aktiven Seiten der Enzyme und hemmen auf diese Weise die Hydroxylierung der Pharmaka kompetitiv (62). Das Reagenz SKF 525A (Diäthylaminoäthyl-diphenyl-n-Propylacetat) und einige andere Reagenzien hemmen den Metabolismus vieler Arten von Pharmaka (63). Man glaubt, daß SKF 525A das Durchdringen der Pharmaka in die Leber-Mikrosomen, wo die sie metabolisierenden Enzyme lokalisiert sind, hemmt. Andererseits konnte NETTER (64) zeigen, daß SKF 525A ein nicht-kompetitiver Inhibitor der O-Demethylase aus Rattenleber-Mikrosomen ist.

4.4.1. Hemmung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch 2,4-Dinitrophenol

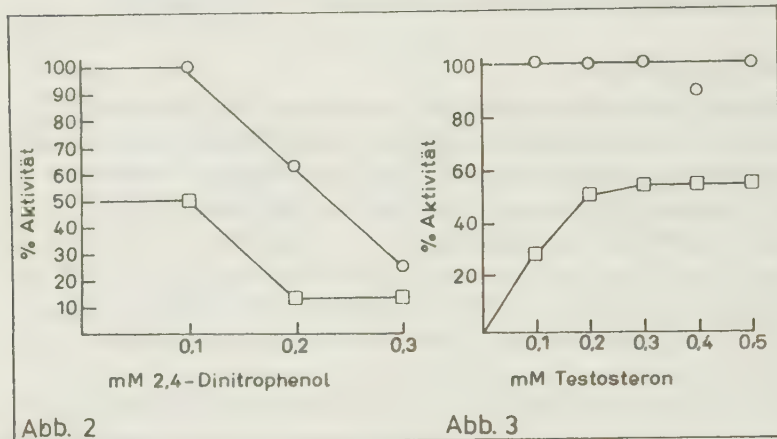


Abb. 2: Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase und des Leerschleichts durch 2,4-Dinitrophenol. Das Reaktionsgemisch (3ml für die INH-Reaktion, 1ml für den optischen Test) enthielt in einem 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 0,4mM NADPH, 0,1mM Testosteron, 0,3mg Mikrosomen-Protein/ml; $\square$ — $\square$ Leerschleichen (gemessen im optischen Test), $\circ$ — $\circ$ Steroid-5 α -Reduktase (gemessen durch INH-Reaktion).

Abb. 3: Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch 2,4-Dinitrophenol bei einer Substrat (Testosteron)-Konzentration im Sättigungsbereich. Das Reaktionsgemisch enthielt (3ml) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH, 0,3mg Mikrosomen-Protein/ml, $\circ$ — $\circ$ ohne 2,4-Dinitrophenol, $\square$ — $\square$ mit 0,2mM 2,4-Dinitrophenol. Die Reaktion wurde nach 10min gestoppt und mit dem INH-Nachweis gemessen.

Dazu führten wir zwei Experimente durch. Einmal bestimmten wir durch ansteigende 2,4-Dinitrophenol-Konzentration die Hemmwirkung des Phenols auf die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase. Das andere Experiment sollte durch eine konstante Konzentration des Hemmstoffes sowie durch variiierende Substrat-Konzentrationen im

Sättigungsbereich den Einfluß des Inhibitors auf ansteigende Testosteron-Konzentrationen klären. Die Abb. 2 und 3 geben darüber Aufschluß.

2,4-Dinitrophenol inhibiert die sog. Leeroxidation von NADPH als auch die $\text{NADPH}:\Delta^4\text{-3-Ketosteroid-Oxidoreduktase}$. Der Hemmeffekt beträgt 80% bzw. 75% bei einer Endkonzentration von 0,3mM 2,4-Dinitrophenol. Die Inhibitor-Wirkung kann durch steigende Substratkonzentration teilweise aufgehoben werden. Abb. 3 zeigt, daß die Hemmwirkung durch erhöhte Testosteron-Konzentrationen bis auf 55% der ungehemmten Reaktion reduziert wird, wenn das molare Verhältnis Testosteron/2,4-Dinitrophenol mindestens eins beträgt. Ist es kleiner, so steigt die Hemmwirkung an, ist es größer, so wird kein weiteres Abnehmen der Inhibition gemessen.

4.4.2. Hemmung der $\text{NADPH}:\Delta^4\text{-3-Ketosteroid-Oxidoreduktase}$ durch Pentachlorophenol

Die Reduktion von Testosteron zu Dihydrotestosteron und Androstadiol durch Rattenleber-Mikrosomen ist in Gegenwart von Pentachlorophenol stark gehemmt. Wie in Abb. 4 ersichtlich, beginnt die Inhibition sowohl bei der Steroid-Reduktion als auch bei dem Leerschleib bei einer Konzentration von 0,1mM Pentachlorophenol, beträgt 90% bei 0,6mM Hemmstoff und 100%, wenn 1,23mM Pentachlorophenol zugefügt werden.

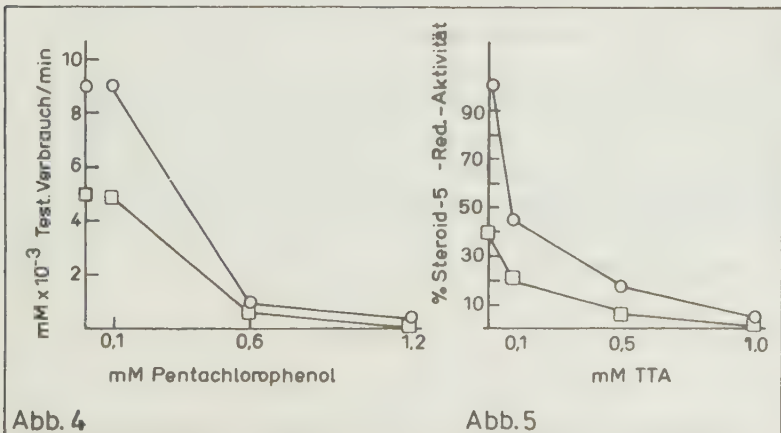


Abb. 4: Hemmung der Steroid- 5α -Reduktase durch Pentachlorophenol. Das Reaktionsgemisch enthielt (3,0ml für den INH-Nachweis und 1,0ml im optischen Test) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH, 0,1m Testosteron; 0,3mg Mikrosomen-Protein/ml; $\square$ — $\square$ Leerschleich (gemessen im optischen Test); $\circ$ — $\circ$ Steroid- 5α -Reduktase-Aktivität (gemessen durch INH-Reaktion).

Abb. 5: Hemmung der Steroid- 5α -Reduktase durch TTA. Das Reaktionsgemisch enthielt (3,0ml für den INH-Nachweis und 1,0ml im optischen Test) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH, 0,1mM Testosteron; 0,3mg Mikrosomen-Protein/ml; $\square$ — $\square$ Leerschleich (gemessen im optischen Test) $\circ$ — $\circ$ Steroid- 5α -Reduktase (gemessen durch INH-Reaktion).

4.4.3. Hemmung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch 4,4,4-Trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butan-2-on (TTA)

TTA ist ein starker Inhibitor der Steroid-Reduktion. Bei einer Hemmstoff-Endkonzentration von 1mM liegen schon keine Aktivitäten mehr vor. In Gegenwart von 10^{-4} M TTA werden die Steroid- 5α -Reduktase zu 55% und der Leerschleich zu 38,5% inhibiert (Abb. 5).

4.4.4. Hemmung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase mit Atebrin

Die Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktion von Testosteron mit Hilfe von NADPH und Original-Mikrosomen wird in Gegenwart von Atebrin stark unterdrückt. Der Leerschleich, aber auch die Steroid-Hydrogenierung, sind nicht mehr meßbar in Gegenwart von 1mM Atebrin. Liegt Atebrin in einer Konzentration von 0,75mM vor, so beträgt die Hemmung des Leerschleichts noch 100%, die der Steroid-Reduktion 75%. Bei 0,5mM Inhibitor-Konzentration werden der Leerschleich auf 54% und die Steroid-Reduktion auf 74% der ungehemmten Reaktion reduziert (Abb. 6).

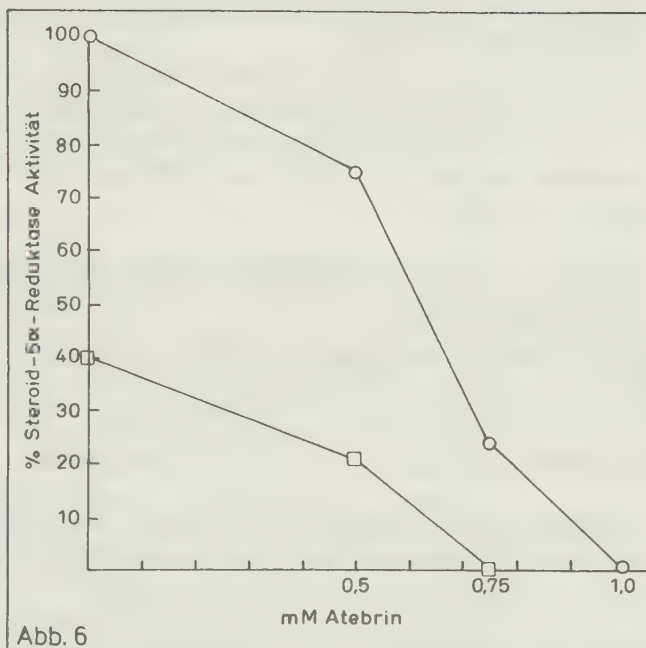


Abb. 6: Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin. Das Reaktionsgemisch (3,0ml für die INH-Reaktion, 1,0ml für den optischen Test) enthielt 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,1mM Testosteron; 0,3mg Mikrosomen-Protein/ml; $\square$ — $\square$ Leerschleib (optischer Test); $\circ$ — $\circ$ Steroid-5 α -Reduktase (INH).

4.4.5. Hemmung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch NADP⁺

NADP⁺ inhibiert die Steroid-Reduktion und den Leerschleib nur leicht. Bei einem Verhältnis von NADPH/NADP⁺ 1:1, beträgt der Hemmeffekt 50%.

4.4.6. Hemmung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch Gallussäure-Propylester

Gallussäure-Propylester, ein spezifischer Hemmstoff der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase aus Rattenleber-Mikrosomen (65), inhibiert auch die Steroid-Reduktion. Der Hemmeffekt beträgt bei 10^{-3} M Inhibitor 0%, bei 5×10^{-3} M schon 80%, bei 10^{-2} M Gallussäure-Propylester 100%.

4.4.7. Hemmung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch weitere Hemmstoffe

Die Steroid-Reduktion kann durch 1mM Amytal (Na-5-Äthyl-5-Isoamylbarbiturat), $0,33 \times 10^{-4}$ M Rotenon, 1mM Bathocuproindisulfonsäure, 1mM Diäthylthiocarbamat, 10^{-5} M Dicoumarol (Bishydroxycoumarin) sowie Sättigung mit CO nicht gehemmt werden.

4.4.8. Hemmung der mit Lubrol solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase mit den Hemmstoffen 2,4-Dinitrophenol, Pentachlorophenol, Atebrin, TTA

Die unter 4.3.1. bis 4.3.4. beschriebenen Hemmstoffversuche wurden unter den gleichen Bedingungen (0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 0,4mM NADPH, 0,1mM Testosteron, 0,3mg/ml) mit solubilisierter NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktase durchgeführt.

4.4.8.1. 2,4-Dinitrophenol

In den unter 4.4.1. angegebenen Konzentrationen von 2,4-Dinitrophenol übt die Phenolverbindung 100% Hemmung auf die enzymatische Reaktion aus. Während Original-Mikrosomen (nicht solubilisiert) durch 0,1mM 2,4-Dinitrophenol in ihrer Fähigkeit, Testosteron zu reduzieren, noch nicht unterdrückt werden, beträgt der Inhibitoreffekt bei der gleichen Hemmstoff-Konzentration 100% im Falle von solubilisierten Mikrosomen.

4.4.8.2. Pentachlorophenol

Auch bei Pentachlorophenol können wir durch Solubilisieren der Steroid-Reduktase eine Steigerung des Hemmeffektes auf die Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktion feststellen. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 0,1mM Pentachlorophenol betrug die Hemmwirkung

auf die Steroid-Reduktion der Original-Mikrosomen 0%, auf die Steroid-Hydrogenierung der solubilisierten Mikrosomen 79%. Alle höheren Pentachlorophenol-Konzentrationen, die bei Original-Mikrosomen noch meßbare Steroid-5 α -Reduktase-Aktivitäten erlauben, haben 100% Hemmeffekt auf mit Detergenz solubilisierter Mikrosomen.

4.4.8.3. TTA

TTA zeigt eine erhöhte Hemmwirkung auf die mit Lubrol in Lösung gebrachte Steroid-Reduktase im Vergleich zu der Reduktase in Original-Mikrosomen. Schon bei einer Konzentration von 0,1M TTA sind nur noch 12% der ursprünglichen Aktivität vorhanden, mit Original-Mikrosomen hingegen 45%. Liegen höhere Konzentrationen von TTA vor, so fällt im Falle von solubilisierter Mikrosomen die Steroid-5 α -Reduktion auf 0% ab. Bei Original-Mikrosomen konnten aber noch meßbare Werte erhalten werden.

4.4.8.4. Atebrin

Eine Solubilisierung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase mit Lubrol hat im Gegensatz mit oben besprochenen Hemmstoffen einen kaum meßbaren Effekt auf die Inhibitor-Wirkung von Atebrin. Original-Mikrosomen werden in Gegenwart von 1mM Atebrin zu 100%, solubilisierter Mikrosomen zu 90% gehemmt. Bei 0,5mM Atebrin erhalten wir 25% Hemmwirkung im Falle des ungelösten Enzyms und 75% Inhibitoreffekt auf die solubilisierter Steroid-5 α -Reduktase.

4.4.10 Zuordnung der Hemmstoffe 2,4-Dinitrophenol, Pentachlorophenol, Atebrin und TTA zu Rezeptorseiten an der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase

Wir testeten im optischen Test die mikrosomale NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase auf ihre Aktivität mit den Substraten DCPIP, Vitamin K₃, und Cytochrom c in Gegenwart obiger Hemmstoffe. Die genauen Versuchsbedingungen sind unter 3.2.3.4. bis 3.2.3.6. beschrieben, die Endkonzentrationen der jeweiligen Hemmstoffe betrugen 10⁻³M.

In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 3:

eingesetzter H ₂ -Akzeptor	gemessene NADPH: H ₂ -Akzeptor-Oxidoreduktase-Aktivität in % in Gegenwart der Hemmstoffe (100% = ungehemmte Reaktion)			
	2,4-Dinitrophenol (10 ⁻³ M)	Atebrin (10 ⁻³ M)	TTA (10 ⁻³ M)	Pentachlorophenol (10 ⁻³ M)
DCPIP	0	27,3	5,74	100
Cytochrom c	0	0,43	0	100
Vitamin K ₃	0,25	28,3	3,7	100

Mit einer Ausnahme (Atebrin bei der Cytochrom c-Reduktion) erhalten wir für die Hemmung der NADPH: H₂-Akzeptor-Oxidoreduktasen mit verschiedenen H₂-Akzeptoren übereinstimmende Resultate. 2,4-Dinitrophenol (10⁻³M) hemmt zu 100% sowohl die DCPIP-Reduktion als auch die von Cytochrom c und Vitamin K₃. Eine ähnliche Übereinstimmung erhalten wir mit TTA, wo die Inhibition bei allen drei H₂-Akzeptoren mindestens 95% beträgt. Auch mit Pentachlorophenol erhalten wir parallel verlaufende Resultate. Weder die Reduktion von DCPIP noch die von Cytochrom c und Vitamin K₃ werden durch 10⁻³M Pentachlorophenol gehemmt. Mit Atebrin beobachten wir jedoch unterschiedliche Hemmeffekte. Die DCPIP- und Vitamin-K₃-Reduktion werden etwa in dem gleichen Maße (70%), die Cytochrom c-Reduktion unterscheidbar davon zu 100% unterdrückt.

Da alle 4 Hemmstoffe mit oben angewendeten Konzentrationen die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase stark inhibieren, aber nur die Hemmstoffe 2,4-Dinitrophenol, TTA und Atebrin die NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase inhibieren, muß bei der mikrosomalen NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase außer der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase (siehe Diskussion) noch mindestens ein weiteres Enzym existieren, welches durch Pentachlorophenol beeinflussbar ist.

Tabelle 3a: Übersicht über Hemmstoffversuche (4.4.9.)

Hemmstoff	Funktion	Angewandte Konzentration (mM)	Aktivität der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase in Gegenwart des Hemmstoffes	solubilisiertes Enzym
			nicht solubilisiertes Enzym	
2,4-Dinitrophenol	Anti-Vitamin K	0,1	100 %	0 %
	Metabolit	0,2	62 %	0 %
		0,3	25 %	0 %
Pentachlorophenol	Anti-Vitamin K	0,1	100 %	21 %
	Metabolit	0,6	10 %	0 %
		1,23	0 %	0 %
Atebrin	Hemmstoff für Flavinenzyme	0,1	100 %	100 %
		0,5	74 %	24 %
		0,75	0 %	10 %
TTA	Hemmstoff für Elektronentransport	0,1	45 %	12 %
	FAD $\longrightarrow$ CoQ	0,5	15 %	0 %
		1,0	0 %	0 %
NADP ⁺		0,4	50 %	—
Gallussäure-Propylester	Hemmstoff der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase	1,0	100 %	100 %
		5,0	20 %	0 %
		10,0	0 %	0 %

Fortsetzung von Tabelle 3a:

Hemmstoff	Funktion	Angewandte Konzentration (mM)	Aktivität der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid- Oxi- doreduktase in Gegenwart des Hemmstoffes	
			nicht solubilisiertes Enzym	solubilisiertes Enzym
Amytal	Flavin-Hemmstoff	1,0	100 %	—
Rotenon	Flavin-Hemmstoff	0,033	100 %	—
Bathocouproin- disulfonsäure	Cu-Enzym-Hemmst.	1,0	100 %	—
Diäthylthio- carbamat	Cu-Enzym-Hemmst.	1,0	100 %	—
Dicoumarol	Anti-Vitamin K Metabolit	10^{-2}	100 %	—
CO	Metallo-Enzym Hemmstoff	Sättigung	100 %	—
α - α' -Dipyri- dyl	Fe^{2+} -Enzym- Hemmstoff	1,0	100 %	—

4.5. Resultate aus kinetischen Experimenten, die zur Aufklärung der an der Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktion beteiligten Faktoren führen

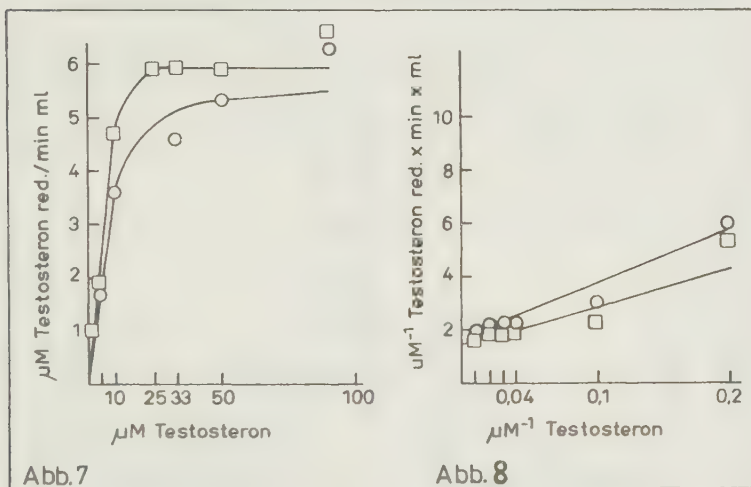


Abb. 7: Aktivierung der Steroid-5 α -Reduktase durch Vitamin K₃ in Tris-HCl. Das Inkubationsmedium (3ml) enthielt 0,02M Tris-HCl pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,3mg Mikrosomenprotein/ml. $\square$ — $\square$ mit 4mM Menadionbisulfit, $\circ$ — $\circ$ ohne Vitamin K₃. Die Reaktion wurde durch die INH-Methode gemessen.

Abb. 8: Lineweaver-Burk-Plot aus Abb. 7.

4.5.1. Aktivierung der Steroid-5 α -Reduktase durch Vitamin K₃ in Gegenwart von Tris-HCl

Die Substrat (Testosteron)-Sättigungskurve der Steroid-5 α -Reduktase in Tris-HCl, Puffer pH 7,0, zeigt eine Aktivierung des Enzyms in Gegenwart von Vitamin K₃ (Abb. 7). Man kann es auch als eine Hemmung bezeichnen, wenn Vitamin K₃ fehlt. Der Lineweaver-Burk-Plot zeigt, daß diese Hemmung (bei Fehlen von Menadion) einen nicht-kompetitiven Charakter hat. Aus der Abb. 8 errechnet sich die Inhibitorkonstante K_i , die Michaeliskonstante K_m und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $V_{\max}$ aus den Achsen-

abschnitten der Abszisse und Ordinate:

$$K_m = 1,67 \times 10^{-5} \text{ M}; \quad V_{\max} = 9,25 \mu\text{M}/\text{min}, \text{ml}; \quad K_i = 1,54 \times 10^{-3} \text{ M}.$$

4.5.2. Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin

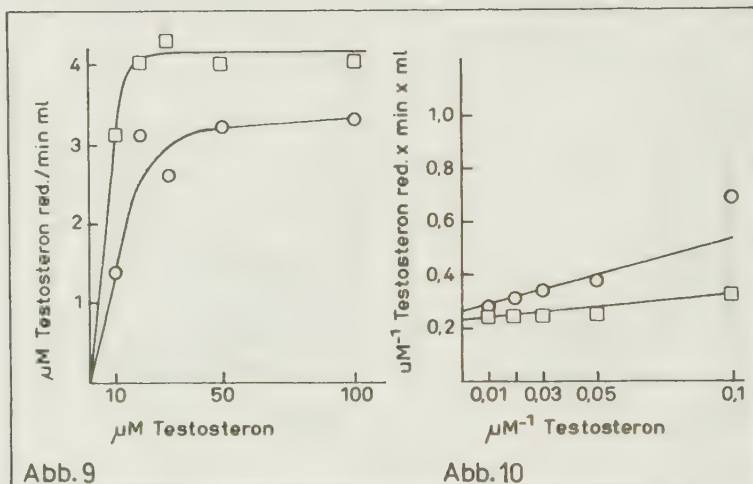


Abb. 9: Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin. Der Testansatz enthielt (3ml) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,3mg Mikrosomenprotein/ml. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch die INH-Methode; $\square$ — $\square$ ohne Atebrin; $\circ$ — $\circ$ mit 0,1M Atebrin.

Abb. 10: Lineweaver-Burk-Plot der Abb. 9.

Wie unter 4.4.4. gezeigt wurde, wird die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch Atebrin gehemmt. Wir untersuchten die Natur dieser Inhibition und berechneten den K_m -Wert sowie die dazugehörige $V_{\max}$ und K_i . In Abb. 9 ist der Michaelis-Menten-Plot und in Abb. 10 der Lineweaver-Burk-Plot der Substratsättigungskurve mit und ohne Atebrin wiedergegeben. Die Hemmung ist nicht-competitiv in Bezug auf Testosteron. Die K_m wird zu $1,30 \times 10^{-5} \text{ M}$ berechnet. Die $V_{\max}$ beträgt $4,34 \mu\text{M}/\text{min}, \text{ml}$, die $K_i = 7,7 \times 10^{-4} \text{ M}$.

4.5.2.1. Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin in Gegenwart von Vitamin K₃

Die Anwesenheit von Vitamin K₃ (Menadionbisulfit) verändert nicht das Ausmaß und nicht den Charakter der Hemmung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch Atebrin (Abb. 10). In Gegenwart von Vitamin K₃ berechnen wir die K_m als $1,14 \times 10^{-5} M$. Dabei ergibt sich eine V_{max} von $7,4 \mu M/min, ml$. Die Inhibitorkonstante wird aus dem y-Abschnitt der gehemmten Gerade im Lineweaver-Burk-Plot berechnet: $K_i = 5,4 \times 10^{-4} M$ (Abb. 12).

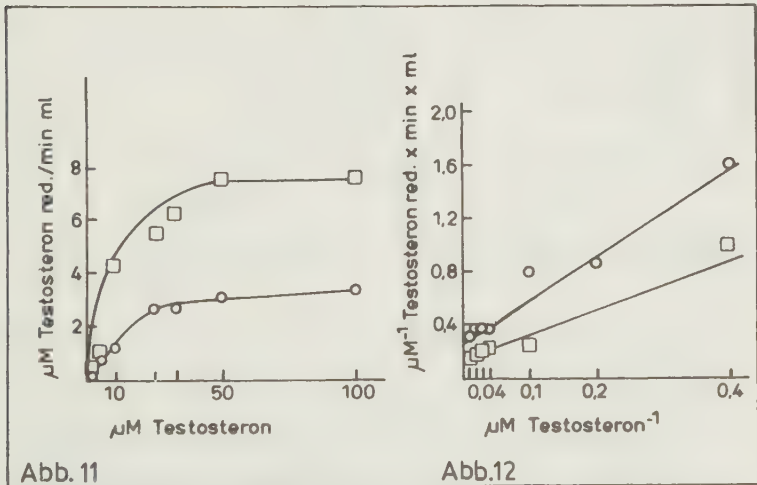


Abb. 11: Hemmung der Steroid-5 α -Reduktase durch Atebrin in Gegenwart von Vitamin K₃. Der Testansatz enthielt (3,0ml) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,3mg Mikrosomen-Protein/ml; 0,01mM Menadionbisulfit ○—○ mit 0,1mM Atebrin, □—□ ohne Atebrin. Die Reaktion wurde durch die INH-Methode gemessen.

Abb. 12: Lineweaver-Burk-Plot der Abb. 11.

4.5.3. Substratsättigungskurve (K_3) der NADPH: Vitamin K_3 -Oxidoreduktase

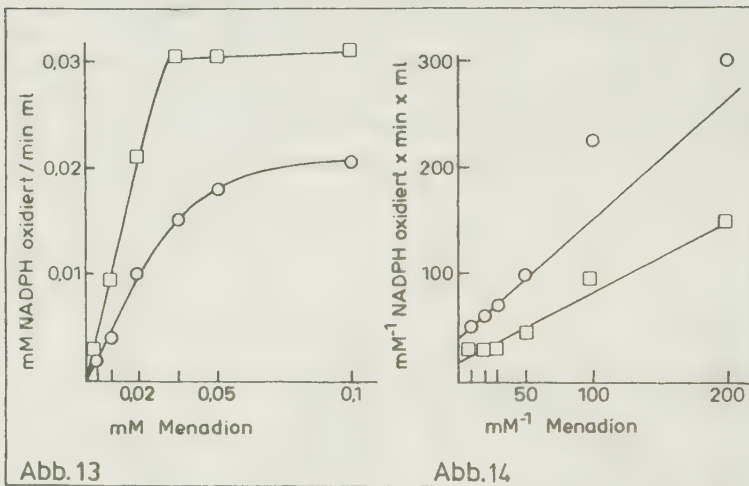


Abb. 13: Substrat-Sättigungskurve der NADPH: Vitamin K_3 -Oxidoreduktase mit Menadion als Substrat. Der Testansatz enthielt (1ml) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,3mg Mikrosomen-Protein; □—□ ohne Atebrin, ○—○ mit 0,1mM Atebrin. Die Reaktion wurde im optischen Test bei einer Extinktion von 336nm gemessen.

Abb. 14: Lineweaver-Burk-Plot der Abb. 13.

Wir vermuteten die Teilnahme der NADPH: Vitamin K_3 -Oxidoreduktase an der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktion. Eine nähere Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der NADPH: Vitamin K_3 -Oxidoreduktion unter den optimalen Bedingungen der Steroid-Reduktion ist daher gerechtfertigt. Die Substratsättigungskurve (Menadion) ist in Abb. 13 wiedergegeben. Atebrin hemmt die Reduktion von NADPH. Wie aus der Abb. 14 zu ersehen ist, kann die Hemmung als nicht-kompetitiv bezeichnet werden. Die Michaelis-

Konstante beträgt $3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $V_{\max} = 5,5 \times 10^{-5} \text{ M/min, ml}$.
Die Inhibitorkonstante K_i berechneten wir als $8,5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

4.5.3.1. Die Substratsättigungskurve (NADPH) der NADPH: Vitamin
 K_3 -Oxidoreduktase

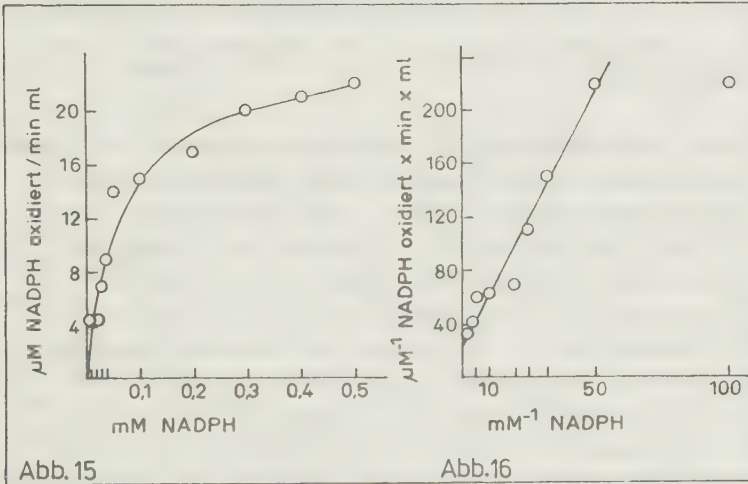


Abb. 15: Substrat-Sättigungskurve der NADPH: Vitamin K_3 -Oxidoreduktase mit NADPH. Der Testansatz enthielt (1,0ml) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 1mM Menadion; 0,3mg Mikrosomen-Protein pro ml. Die Reaktion wurde im optischen Test bei 336nm gemessen.

Die Abhängigkeit der Vitamin K_3 -Reduktion von ansteigenden NADPH-Konzentrationen ist in Abb. 15 wiedergegeben. Durch graphische Bestimmung (Abb. 16) berechneten wir die K_m und $V_{\max}$.

$$K_m = 7,7 \times 10^{-5} \text{ M}, V_{\max} = 25 \mu\text{M/min, ml}.$$

4.5.4. Fraktionierung der solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Keto-steroid-Oxidoreduktase und der NADPH: H_2 -Akzeptor-Reduktasen durch Ammoniumsulfat

Wie schon bei der Zwei-Substrate-Kinetik beobachtet, sind die NADPH: Vitamin K_3 -Oxidoreduktase sowie die NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase mit der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität korreliert. Bei einer Fraktionierung der oben genannten Aktivitäten mit Ammoniumsulfat sollte eine entsprechende Korrelation gefunden werden.

Zu diesem Zweck solubilisierten wir Original-Mikrosomen wie unter 4.6.2.1. beschrieben. Der Überstand der 144 000xg-Zentrifugation wurde mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 30% versetzt. Nach Äquilibrierung und Trennung von Flotat und löslicher Phase durch Zentrifugation lösten wir das Flotat in Solubilisierungspuffer auf. Der Überstand und das Flotat der 30% $(NH_4)_2SO_4$ -Fraktionierung wurden dann auf die oben erwähnten Aktivitäten getestet. In Relation zu den nicht-fraktionierten solubilisierten Mikrosomen können wir folgende Angaben machen: Die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität ist zu 93% in dem 30% $(NH_4)_2SO_4$ -Flotat vorzufinden, während nur 6,7% der Steroid-Reduktion in dem entsprechenden Überstand gehen.

Die NADPH:Vitamin K_3 -Oxidoreduktase-Aktivität kann ebenso wie die Steroid- 5α -Reduktase durch Versetzen der solubilisierten Mikrosomen mit 30% Ammoniumsulfat ausgefällt werden. Wir fanden in dem Flotat der oben beschriebenen Fraktionierung 76% der Vitamin K_3 -Reduktion, während in dem entsprechenden Überstand nur 24% der Vitamin K_3 -Hydrogenierung abliefen.

Auch die NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase-Aktivität wird durch 30% $(NH_4)_2SO_4$ zum großen Teil ausgesalzt. 67% der Cytochrom c-Reduktion werden in dem 30% $(NH_4)_2SO_4$ -Flotat wiedergefunden gegenüber 33% in dem Überstand.

Als einzige der getesteten NADPH: H_2 -Akzeptor-Oxidoreduktasen kann durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung die NADPH: DCPIP-Oxidoreduktase nicht mit der Steroid- 5α -Reduktase korreliert werden.

Im Gegensatz zur Steroid-Reduktion ist die DCPIP-Reduktase durch 30% Ammoniumsulfat nicht zu präzipitieren, da die entsprechende Aktivität fast vollständig (77%) in dem Überstand der 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionierung zu finden ist. Das Sediment enthält nur 23% der DCPIP-Reduktase-Aktivität.

Die Ergebnisse sind noch einmal in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Ammoniumsulfat-Fraktionierung von solubilisierten Mikrosomen

Fraktion	vorgefundene Aktivitäten der			
	Steroid- 5 α -Red.	DCPIP-Red.	Vit. K ₃ -Red.	Cyt. c-Red.
30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Überstand	6,7 %	77 %	24 %	33 %
30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Flotat	94,0 %	23 %	76 %	67 %

4.5.5. Zwei-Substrate-Kinetik

Durch Anwendung der Zwei-Substrate-Kinetik kann geklärt werden, ob ein Enzym zwei verschiedene Substrate zur gleichen Zeit metabolisiert (53). Dabei muß eines der beiden Substrate schnell, das andere langsam umgesetzt werden. Weiterhin muß die Möglichkeit bestehen, die Gesamtreaktion messen zu können. Diese Methode wurde z. B. zur Klärung der Frage herangezogen, ob mehr als ein mikrosomales Enzymsystem an der Deaktivierung von Pharmaka teilnimmt (67).

4.5.5.1. Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: DCPIP-Oxidoreduktase mit Testosteron und DCPIP

Abb. 17 zeigt, daß die NADPH-Oxidation in Gegenwart ansteigender DCPIP-Konzentrationen erhöht wird, wenn eine konstante Menge an Testosteron hinzugefügt wird. Diese Erhöhung der NADPH-Dehydrogenierung bleibt konstant über alle Konzentrationen von DCPIP (0,002-0,1mM) hinweg. Von den sieben untersuchten Meßpunkten sind die Unterschiede der beiden Kurven bei 0,002, 0,004 und 0,1mM

DCPIP signifikant, die anderen Werte können statistisch nicht unterschieden werden. Der Lineweaver-Burk-Plot ist in Abb. 18 wiedergegeben.

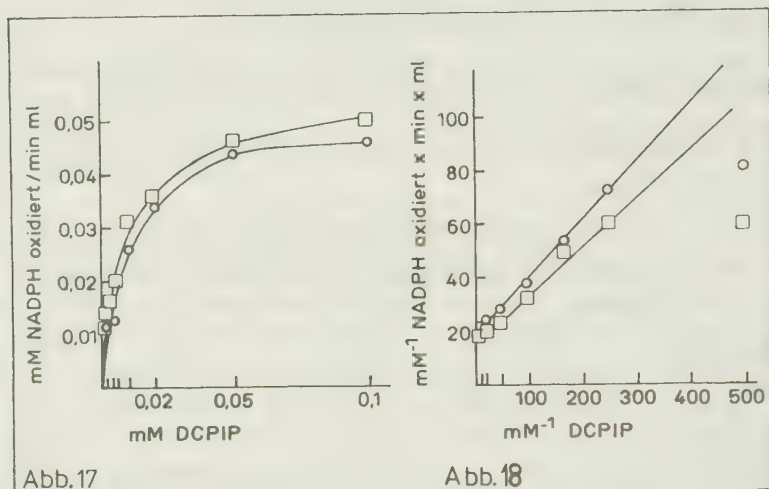


Abb. 17: Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: DCPIP-Oxidoreduktase mit DCPIP und Testosteron. Der Enzymsatz enthielt (1,0ml) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,1mg Mikrosomen-Protein □—□ mit 0,1mM Testosteron, ○—○ ohne Testosteron. Die Reaktion wurde im Photometer-Eppendorf bei 366nm gemessen.

Abb. 18: Lineweaver-Burk-Plot der Abb. 18.

4.5.5.2. Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: Vitamin K₃-Oxidoreduktase mit Testosteron und Menadion

Bei Anwendung dieser Kinetik auf die mikrosomale Vitamin K₃-Reduktion erhalten wir Kurvenpaare, wie sie in Abb. 19 dargestellt sind. Wir beobachten bei 0,017mM K₃ einen Schnittpunkt der beiden Kurven, der darauf zurückzuführen ist, daß sowohl Testosteron als auch Menadion von dem gleichen Enzym oder Enzymkomplex metabolisiert wird (Abb. 20). Die statistische Signifikanz-Berechnung ergibt, daß lediglich die ersten beiden Meßpunkte (bei 0,002mM K₃)

sowie das dritte Wertpaar (bei 0,006mM K_3) nicht signifikant zu unterscheiden sind. Alle anderen Meßpunkte auf den beiden Kurven gehören mit mindestens 91% Wahrscheinlichkeit nicht zur gleichen Zahleneinheit.

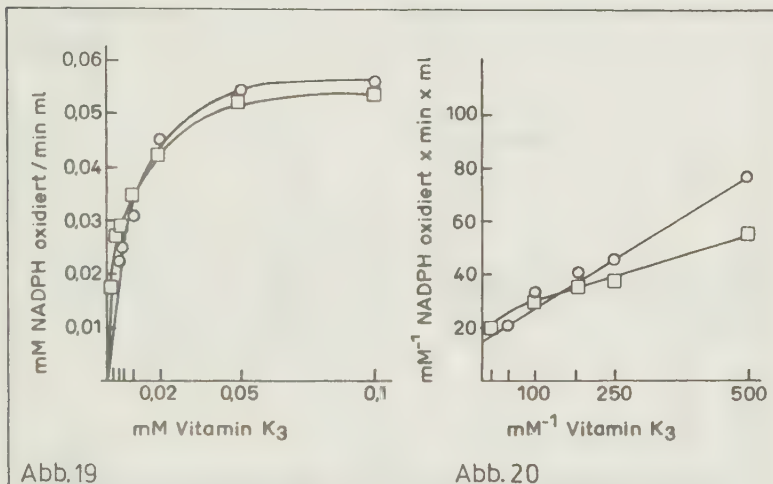


Abb. 19: Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: K_3 -Oxidoreduktase mit Vitamin K_3 und Testosteron. Der Enzymsatz (1,0ml) enthält 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,3mg Mikrosomen-Protein/ml; □—□ mit 0,1mM Testosteron, ○—○ ohne Testosteron. Die Reaktion wurde im Photometer-Eppendorf bei 366nm gemessen.

Abb. 20 Lineweaver-Burk-Plot der Abb. 19.

4.5.5.3. Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase in Gegenwart von Testosteron und Cytochrom c

In Abb. 21 sind die Aktivitäten der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase mit und ohne Testosteron als Durchschnittswerte von 12-16 Untersuchungen aufgetragen. Wir sehen, daß bei etwa 0,008 mM Cytochrom c ein Schnittpunkt der beiden Kurven auftritt. Bei kleineren Cytochrom c-Konzentrationen liegt die Oxidation von NADPH in Gegenwart von Testosteron höher, bei größeren Konzentrationen

als $8\mu\text{M}$ Cytochrom c niedriger im Vergleich mit der einfachen Dehydrogenierung von NADPH durch Cytochrom c. Es ist deutlich, daß eine Substrat-Hemmung durch Cytochrom c zu beobachten ist, die jedoch nicht so stark ausgeprägt zu sein scheint in Gegenwart von Testosteron. Von den fünf untersuchten Kurvenpunkten gehören alle zu vergleichenden Werte verschiedenen Zahleneinheiten an bis auf den Schnittpunkt selbst sowie das letzte Wertepaar.

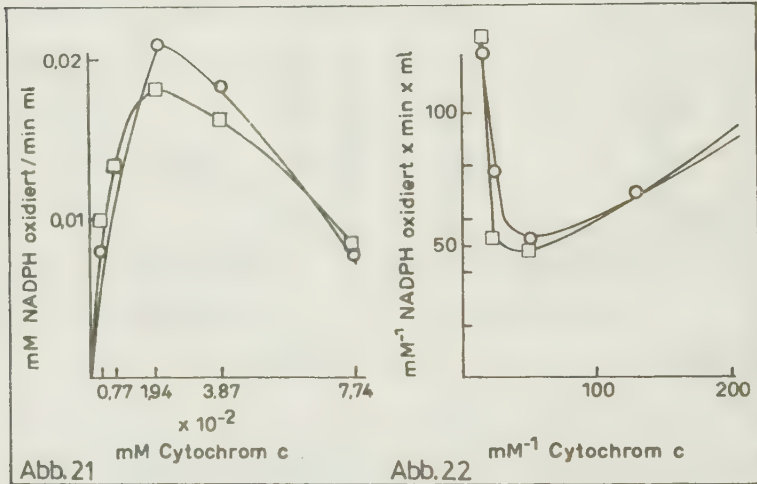


Abb. 21: Zwei-Substrate-Kinetik der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase mit Testosteron und Cytochrom c. Der Testansatz enthielt 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,4mM NADPH; 0,1mg Mikrosomenprotein. □—□ mit 0,1mM Testosteron, ○—○ ohne Testosteron. Die Reaktion wurde am Photometer-Eppendorf bei 366nm gemessen.

Abb. 22: Lineweaver-Burk-Plot aus Abb. 21.

4.5.6. Abhängigkeit der Testosteron-Reduktion von reduzierten Chinon-Verbindungen

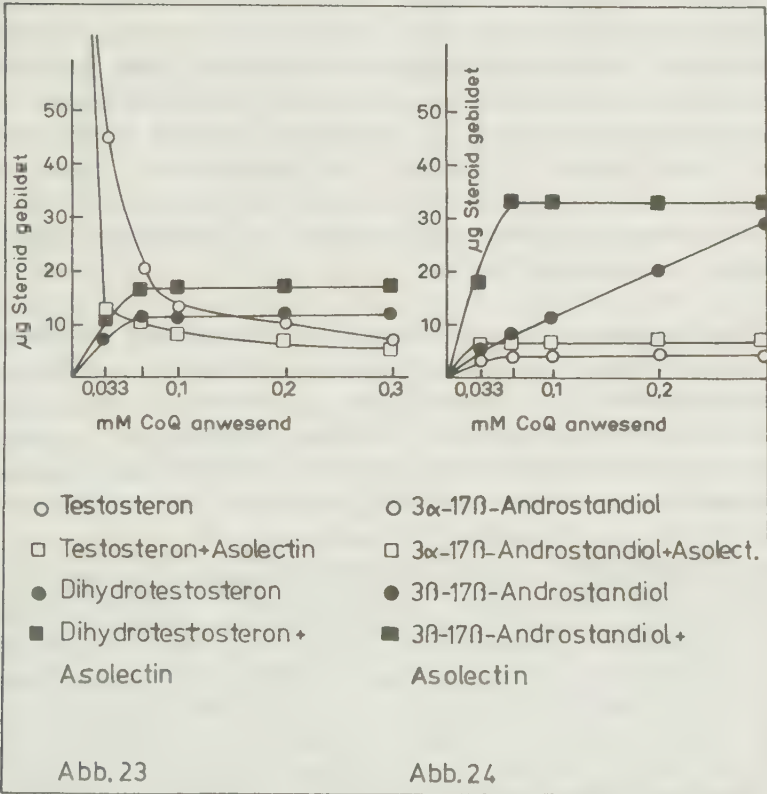


Abb. 23 und 24: Bildung von Produkten der mikrosomalen Testosteron- Δ^4 -3-Keto-Reduktion mit reduziertem CoQ_6 . Die Bestimmung der Steroide erfolgte im Gaschromatographen. Das Inkubationsmedium enthielt (3,0ml) 0,2M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0; 0,1mM Testosteron; 4,5mg Mikrosomenprotein. Vor dem Addieren der Mikrosomen und des Testosterons wurde das CoQ_6 mit einer Spatelspitze NaBH_4 reduziert. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. In den Proben mit □—□ oder ■—■

waren 0,3mg Asolectin enthalten.

Die Annahme, daß Vitamin K₃ oder Coenzym Q als Mittler zwischen der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase und der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase steht, können wir durch den Einsatz reduzierter Chinon-Verbindungen an Stelle des NADPH in Gegenwart von Mikrosomen beweisen. Wir reduzierten ansteigende Konzentrationen von Vitamin K₃, Coenzym Q₆, Coenzym Q₆ plus Asolectin und Coenzym Q₁₀ mit NaBH₄ und setzten diese Chinol-Verbindungen dann als Wasserstoffdonator bei der mikrosomalen Δ^4 -3-Keto-Reduktion der Steroide ein. Die Ergebnisse sind in Abb. 23, 24 dargestellt.

Während mit Menadiol weder Dihydrotestosteron noch Androstandiol entstanden sind, konnten wir mit reduziertem CoQ₆ und CoQ₁₀ deutliche Mengen von Produkten der Δ^4 -3-Keto-Reduktion von Testosteron beobachten, die in Abhängigkeit von der eingesetzten Chinol-Konzentration standen. Durch den Einsatz ansteigender Konzentrationen von reduziertem CoQ₆ beobachten wir bei der Produktbildung eine typische Sättigungskurve. Mit 0,066mM CoQ₆ wird der Sättigungspunkt sowohl bei der Bildung von Dihydrotestosteron (0,013mM) als auch von 3 α -17 β -Androstandiol (0,0046mM) erreicht. 3 β -17 β -Androstandiol dagegen steigt relativ linear bis zu der Endkonzentration von 0,3mM CoQ₆ an. Durch Zugabe von Asolectin zu reduziertem CoQ₆ erreichen wir eine Steigerung der Reduktion von Testosteron. Die Konzentration von 0,066mM CoQ₆ bleibt dabei als optimal bestehen. Jetzt werden 0,019mM Dihydrotestosteron und 0,008mM 3 α -17 β -Androstandiol gebildet. Das Entstehen von 3 β -17 β -Androstandiol läuft nun auch in Form einer Sättigungskurve mit 0,066mM CoQ₆ als Beginn des Sättigungsbereiches (0,039mM 3 β -17 β -Androstandiol werden gebildet) ab.

CoQ₁₀ in der reduzierten Form bewirkt bevorzugt die Reduktion von Testosteron zu Dihydrotestosteron. 3 α -17 β -Androstandiol und 3 β -17 β -Androstandiol werden nun in wesentlich geringerem Maß gebildet. Die Sättigungskurven der Produktbildung mit CoQ₁₀ gleichen denen mit CoQ₆ plus Asolectin. Durch die mikrosomale Reduktion von Testosteron zu Dihydrotestosteron und Androstandiol

in Gegenwart von CoQ_{10} entsteht bei einer Konzentration von 0,066mM Wasserstoffdonator sehr viel mehr Dihydrotestosteron (0,02mM) als in Gegenwart von CoQ_6 (0,013mM Dihydrotestosteron). Auch die Bildung von 3α -17 β - (0,0057mM) und 3β -17 β -Androstandiol (0,023mM) liegt mit CoQ_{10} höher als mit CoQ_6 , aber immer niedriger als mit CoQ_6 plus Asolectin. Bemerkenswert ist jedoch, daß der Sättigungspunkt bei der Entstehung von 3β -17 β -Androstandiol bei etwa 0,07mM CoQ_{10} zu beobachten ist, ähnlich wie in Gegenwart von CoQ_6 plus Asolectin.

Bei Einsatz von $\text{CoQ}\cdot\text{H}_2$ als Wasserstoffdonator beobachten wir die schon unter 4.1. angesprochenen Wechselbeziehungen zwischen Dihydrotestosteron und 3α -17 β -Androstandiol. Ist zum größten Teil Dihydrotestosteron entstanden, so schließt dies die Bildung größerer Mengen an 3α -17 β -Androstandiol aus und umgekehrt. Durch Inkubation von Hitze- (10min bei 100°C) inaktivierten Mikrosomen mit $\text{CoQ}\cdot\text{H}_2$ und Testosteron lassen sich keine Produkte (Dihydrotestosteron und Androstandiol) beobachten. Es ist also ein Enzym an der Reduktion von Testosteron mit Hilfe von $\text{CoQ}\cdot\text{H}_2$ beteiligt.

4.6. Solubilisierung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase

Die einzige, direkte und aussagefähige Methode, integrierte metabolische Reaktionen von Biomembranen aufzuklären, scheint die Restauration der biologischen Funktion durch kontrollierte Rekombination der solubilisierten Membrankomponenten zu sein (68). Die drei Schritte, die man dabei anwendet, sind erstens die Solubilisierung der Biomembran, zweitens die biologische und physikalische Charakterisierung der solubilisierten Produkte und drittens die Rekombination der Komponenten zu voller biologischer Aktivität.

Bei der sogenannten Solubilisierung entsteht keine molekulare Lösung oder gar eine homogene Suspension von Lipoprotein-Untereinheiten, sondern es findet lediglich eine drastische Verkleinerung des Lipoprotein-Komplexes statt. Nach (69) benutzten wir die Hochgeschwindigkeitszentrifugation als Kriterium für eine Solubilisierung des Endoplasmatischen Retikulums. Wir definieren

eine Fraktion als solubilisiert, wenn bei einer Zentrifugation von 144 000xg (1 Stunde) kein Sediment entsteht.

4.6.1. Solubilisieren durch Beschallen

Der Vorteil dieser Art der Solubilisierung liegt darin, daß kein Detergenz oder organisches Lösungsmittel zu dem System hinzugegeben werden muß. Obwohl Ultraschall angewendet wurde, um viele biologische Membranen zu solubilisieren (70), und obwohl klare Lösungen erreicht werden, die in der analytischen Ultrazentrifugation nur einen Schlieren-Peak zeigen (71), ist das Material oft inhomogen und besteht aus allen Arten von Membran-Fragmenten (72). Gerade SCHULZE und STAUDINGER (101) haben nachgewiesen, daß durch Ultra-Beschallung von Mikrosomen unterschiedlich dichte Partikelpopulationen gewonnen werden, denen sogar unterschiedliche Enzymaktivitäten zugeordnet werden können.

Wir führen die Solubilisierung der NADPH: Δ^4 -3-Katosteroid-Oxidoreduktase mit Hilfe des Ultraschallgerätes folgendermaßen durch: 4,0ml eines 0,01M Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 wurden mit 2,5ml einer Mikrosomenlösung, die 20mg Protein/ml enthielt, sowie mit 300mg Asolectin oder 300mg Lecithin oder einer Kombination von beiden (je 150mg) fünf Minuten lang beschallt. Als Kontrollen dienten Ansätze, die 1.) nur 300mg Asolectin, oder 2.) nur 300mg Lecithin, oder 3.) die Kombination beider in 6,5ml des obigen Puffers, sowie 4.) nur 2,5ml Mikrosomen in 4,0ml des Kaliumphosphat-Puffers mit gleicher Beschallungszeit. Nach Zentrifugation aller Proben bei 144 000xg (60min) hoben wir den Überstand vorsichtig ab und lösten das Sediment in 6,5ml des Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 auf. Anschließend bestimmten wir die Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität sowie die Protein-Konzentrationen in allen Fraktionen. Die Steroid-Reduktion wurde quantitativ mit dem INH-Test sowie dem optischen Test, qualitativ mit Hilfe der Gas-Chromatographie bestimmt.

In einem Parallel-Experiment testeten wir den Effekt verschieden langer Beschallungszeiten (3,5 und 10min) auf die Solubilisierung von Mikrosomen alleine oder mit Asolectin. Die Resultate sind in den Tabellen 5 und 6 aufgeführt.

Tabelle 5: Fraktionierung von Mikrosomen durch Beschallen

Fraktion	Volum. (ml)	mg Protein /ml	Aktivität mM Test.red./min ml	spez. Aktivität mM Test.red./min ml mg	Reinigungs- faktor	Ausbeute %
I Original- Mikrosomen	6,5	20	0,83	$4,15 \times 10^{-2}$	1	100
II Mikrosomen, beschallt (5min)	6,5	20	0,985	$4,92 \times 10^{-2}$	1,18	118
III 144 000xg Überstand aus II	6,0	6,0	0,308	$5,14 \times 10^{-2}$	1,24	34,2
IV 144 000xg Sediment aus II	6,5	14,1	0,615	$4,40 \times 10^{-2}$	1,06	74
V Mikrosomen plus Aso- lectin, 5min beschallt	6,5	20,0	0,678	$3,38 \times 10^{-2}$	0,815	81,5
VI 144 000xg Überstand aus V	6,0	4,07	0,616	$15,40 \times 10^{-2}$	3,71	69
VII 144 000xg Sediment aus V	6,5	17,2	0,0166	$1,0 \times 10^{-5}$	0,024	2
VIII Mikrosomen plus Lecithin, 5min besch.	6,5	20	0	0	0	0

Tabelle 6: Fraktionierung von Mikrosomen durch Beschallen

Fraktion	Volumen (ml)	mg Protein /ml	Aktivität mM Test.red./min ml	spez. Aktivität mM Test.red./min mg	Reinigungs- faktor	Ausbeute %
I Original- Mikrosomen	6,5	20	0,77	$3,85 \times 10^{-2}$	1	100
II Mikrosomen 5min be- schallt	6,5	20	1,23	$6,15 \times 10^{-2}$	1,6	160
III Mikrosomen 10min be- schallt	6,5	20	0,925	$4,62 \times 10^{-2}$	1,2	120
IV Mikrosomen plus Aso- lectin, 5min beschallt	6,5	20	0,616	$3,08 \times 10^{-2}$	0,8	80
V Mikrosomen plus Asolectin 10 min be- schallt	6,5	20	0,432	$2,16 \times 10^{-2}$	0,56	56
VI 144 000xg Überstand aus IV	6,0	5,27	0,616	$11,69 \times 10^{-2}$	3,03	74
VII 144 000xg Überstand aus V	6,0	5,21	0,462	$8,87 \times 10^{-2}$	2,30	55

Der größte Reinigungsfaktor (4-fach) wird im 144 000xg Überstand der mit Asolectin beschallten Mikrosomen beobachtet. Das entsprechende Sediment enthält lediglich 2% der gesamten Aktivität. Die Ausbeute dieses Solubilisierungsschrittes beträgt 69%. Werden Mikrosomen ohne Phospholipid-Zusatz beschallt, so ist vor der Zentrifugation eine leicht erhöhte Aktivität der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase festzustellen (118%). Nach 105 000xg Zentrifugation enthält der daraus entstandene Überstand 34,2% der gesamten Aktivität, aber auch hier wird ein Reinigungsfaktor von 1,24 gemessen.

Mikrosomen, die mit Rohlecithin beschallt wurden, enthalten keine Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität. Auch nach Beschallung mit gleichen Mengen an Asolectin und Lecithin konnten wir bei Rattenleber-Mikrosomen sowohl mit Hilfe des INH-Testes als auch durch den optischen Test keine Steroid-Reduktion beobachten. Dies läßt darauf schließen, daß im Rohlecithin ein Faktor enthalten ist, der die Aktivität, bzw. die Reaktivierung durch Phospholipid-Micellen hemmt.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der zeitabhängigen Beschallung von Mikrosomen mit und ohne Asolectin enthalten. Auch hier stellen wir fest, daß die Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch Beschallen von Original-Mikrosomen aktiviert wird. Diese Erhöhung der enzymatischen Testosteron-Reduktion ist jedoch zeitabhängig. Bei 5 Minuten Beschallen beträgt die Ausbeute 160%, nach 10 Minuten nur noch 120%. Die Anreicherungsfaktoren von 1,6 und 1,2 sind darauf zurückzuführen.

Wie wir an Hand der Reinigungsfaktoren des 144 000xg Überstandes der fünf bzw. zehn Minuten lang beschallten Mikrosomen erkennen, wird das beste Resultat (Reinigungsfaktor 3,03) bei den kürzeren Beschallungszeiten, nämlich nach 5 Minuten, erreicht. Der Reinigungsfaktor nach 10 Minuten Beschallen beträgt 2,3.

Die Resultate nach 3 Minuten Beschallen sind nicht in Tabelle 6 aufgeführt, da die Ausbeute in 144 000xg Überstand nur 36% mit einer Anreicherung von 1,3 betrug. Der Rest der Steroid-5 α -Reduk-

tase-Aktivität war in 144 000xg Sediment zu finden.

4.6.2. Solubilisierung durch Detergenzien

Obgleich ionogene Detergenzien effektiver sind als nicht-ionogene, wirken sich erstere gewöhnlich nachteilig auf enzymatische Aktivitäten aus (73). Die etwas mildereren nicht-ionogenen Detergenzien werden als die erfolgreichsten Mittel bei der kontrollierten Solubilisierung von Biomembranen beschrieben (74). Aber wahrscheinlich ist die Solubilisierung durch sie unvollständig und ihre Entfernung vom solubilisierten Material ist oft nicht möglich (75).

Das Ausmaß der Solubilisierung hängt von der Detergenz-Konzentration ab. Es scheint jedoch nicht die absolute Detergenzien-Konzentration wichtig zu sein, vielmehr ist das Gewichtsverhältnis Detergenz/Membranprotein von entscheidender Bedeutung (76).

Wegen der geringeren Denaturierung in der Kälte ist es ratsam, die Solubilisierung bei niedriger Temperatur durchzuführen. Allerdings ist die Solubilisierungsrate von der Temperatur abhängig (77).

In unseren Experimenten wurden folgende Detergenzien verwendet: Tween 20, Lubrol, Digitonin, Triton N 101, Natriumdesoxycholat, Lensodel NP40, Lensodel NP80. Die Methode der Solubilisierung wurde unter 3.2.5.4. beschrieben. Wenn wir Original-Mikrosomen mit diesen Detergenzien in Lösung brachten, so enthielten sie weder vor noch nach Zentrifugation (Überstand und Sediment, 144 000xg) eine im optischen Test meßbare Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität. Um entscheiden zu können, ob die NADPH: Testosteron-Oxidoreduktase durch die Detergenzien von der Membran gelöst oder ob sie lediglich denaturiert wurde, suchten wir nach Stabilisatoren der enzymatischen Aktivität. Als solcher bietet sich Glycerin an, welches besonders Monooxygenase-Systeme aus Rattenleber-Mikrosomen stabilisieren soll (78).

Die oben beschriebenen Solubilisierungsversuche führten wir nun mit allen Detergenzien in Gegenwart von 33,6% Glycerin durch. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse. In Gegenwart von Lubrol WX plus Glycerin oder Tween 20 plus Glycerin bleibt die Testosteron-

Reduktase-Aktivität in den nicht-zentrifugierten Mikrosomen erhalten, mit allen anderen Detergenzien geht sie selbst in Gegenwart von Glycerin nach 30 Minuten Inkubationszeit verloren. Die Mikrosomen, die Lubrol WX plus Glycerin oder Tween 20 plus Glycerin enthielten, wurden bei 144 000xg zentrifugiert. Wir fanden fast die gesamte Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität in dem dabei erhaltenen Sediment, während der Überstand nur wenig NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase aufwies. Glycerin scheint demnach in der Lage zu sein, die Steroid-Reduktase in Gegenwart von Tween 20 oder Lubrol WX zu stabilisieren, aber das Enzym wird dabei nicht in Lösung gebracht.

Aus diesem Grunde testeten wir andere Effektoren, z.B. Natriumzitrat und Kaliumchlorid (79). In einer Endkonzentration von 0,1M fügten wir Natriumzitrat und KCl zu Mikrosomen und 0,5% Detergenz hinzu. Schon nach 30 Minuten Inkubation war keine Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktase-Aktivität mehr festzustellen. Auch hier besteht die Möglichkeit, daß das Enzym zwar von der Membran abgelöst wird, die Aktivität aber durch den denaturierenden Einfluß der Detergenzien verloren geht.

4.6.2.1. Versuche zur Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase mit Glycerin und Effektoren

Wir inkubierten nach der unter 3.2.5.4. beschriebenen Methode Original-Mikrosomen mit den oben erwähnten Detergenzien (0,5%), sowie 33,6% Glycerin, 0,1M KCl und 0,1M Natriumzitrat. Nach der 144 000xg Zentrifugation (60min) fanden wir im Falle der mit Tween 20 oder Lubrol WX solubilisierten Mikrosomen etwa 80% der gesamten Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität im Überstand. Das Sediment enthält keine Steroid-Reduktase-Aktivität mehr. Alle anderen Detergenzien inaktivieren das Enzym.

Um eine sichere Aussage zu erhalten, ob es sich bei dem solubilisierten Enzym um die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase handelt, führten wir mit Hilfe der Gas-Chromatographie eine Produkt-Bestimmung durch (30min Inkubation). Die in der Tabelle 7 angegebenen Werte wurden aus 3 Untersuchungen ermittelt.

Tabelle 7:

	eingesetztes Testosteron (μ M)	entstandene Produkte			Rest
		3α -17 β -AD (μ M)	3β -17 β -AD (μ M)	DT (μ M)	Testost. (μ M)
Original-Mikrosomen	84	8,4	(6,8)	(44)	-
Mit Tween 20 solubilisierete Mikrosomen	84	9,8	(4,9)	(4,5)	(3,7)
Mit Lubrol WX solubilisierete Mikrosomen	84	28,5	(13,2)	(29,4)	-

Die direkten Produkte Dihydrotestosteron (DT), 3β -17 β -Androstandiol (AD) und 3α -17 β -Androstandiol können im 144 000xg Überstand der mit Lubrol WX und Tween 20 solubilisierten Mikrosomen festgestellt werden. Dabei finden wir in dem Ansatz, der das solubilisierete Enzym enthält, relativ mehr Androstandiol als mit Original-Mikrosomen, dafür aber sehr viel weniger Dihydrotestosteron. Die Solubilisierung mit Tween 20 scheint nicht so effektiv zu sein wie mit Lubrol WX. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß nicht alles eingesetzte Testosteron in der Form dieser Produkte oder als unverbrauchtes Testosteron wiedergefunden wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, daß auch mit den Original-Mikrosomen aus Testosteron und den daraus resultierenden Produkten hydroxylierte Steroide entstehen, die in der obigen Berechnung nicht berücksichtigt sind. Wir stellen weiterhin fest, daß aus 3α -17 β -Androstandiol 3α -5 α -Androsteron gebildet wird und damit auch nicht berücksichtigt werden konnte.

4.6.2.2. Der Einfluß von Natriumzitrat auf die Solubilisierung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch Lubrol WX

Wir inkubierten 0,3mg Mikrosomenprotein/ml, 33,6% Glycerin, 0,5% Lubrol, von 0 bis 0,27M Natriumzitrat ansteigende Effektorenkonzentrationen dreißig Minuten lang bei 4°C. Nach der Zentrifugation bei 144 000xg verwendeten wir den daraus entstehenden Überstand

zur Messung der Steroid-Reduktion mit Hilfe des optischen Testes sowie der INH-Reaktion.

Wie Abb. 25 zeigt, hat die Natriumzitrat-Konzentration offenbar einen großen Effekt auf die Solubilisierung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase. Mit ansteigender Na-Zitrat-Konzentration werden auch steigende Mengen des Enzyms in Lösung gebracht. Das Optimum an enzymatischer Aktivität können wir in dem 144 000xg Überstand nach Solubilisierung in Gegenwart von 0,1-0,13M Na-Zitrat messen. Bei höheren Effektor-Konzentrationen fallen die Werte etwas ab.

In Gegenwart einer konstanten Menge von 0,1M KCl werden im 144 000xg Überstand der mit Lubrol, Glycerin und ansteigenden Na-Zitrat-Konzentrationen solubilisierten Mikrosomen Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktase-Aktivitäten erzielt, die noch etwas über den Werten ohne KCl liegen.

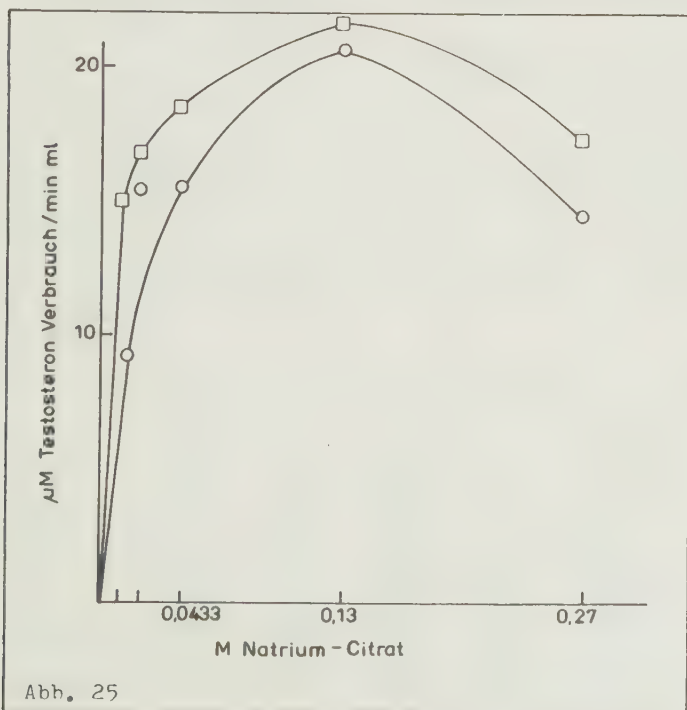


Abb. 25: Abhängigkeit der Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase mit Lubrol von der Natriumzitrats-Konzentration. Die Solubilisierung wurde mit 3mg Mikrosomenprotein/ml, 33,6% Glycerin, 0,5% Lubrol, 30min Inkubation bei 0°C durchgeführt. Der angegebene Testosteron-Verbrauch gilt für den 144 000xg Überstand. Der Aktivitätstest wurde mit der INH-Methode durchgeführt; ○—○ ohne KCl, □—□ mit KCl.

4.7. Untersuchung zur Stabilität der solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase

Die weitere Anreicherung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase erfordert oft tagelanges Arbeiten im Kühlraum. Eine Untersuchung der Stabilität der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase sowie der Möglichkeiten, sie mehrere Tage lang zu erhalten, scheint deshalb angebracht zu sein.

4.7.1. Stabilität des unter 4.6.2.1. solubilisierten Enzyms

Die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase wurde nach 4.6.2.1. solubilisiert und anschließend bei 144 000xg zentrifugiert. Den Überstand bewahrten wir bei 4°C im Kühlraum auf und maßen die Aktivität als eine Funktion der Zeit. Die mit Lubrol WX solubilisierten Mikrosomen haben nach 24 Stunden 26% der gesamten Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität verloren, die mit Tween 20 solubilisierten Mikrosomen 17%. Nach 48 Stunden maßen wir nur noch 60% (Tween 20) bzw. 62% (Lubrol WX) der Steroid-Reduktion. Nach sieben Tage langem Aufbewahren haben die mit Tween 20 und Lubrol WX solubilisierten Mikrosomen 100% der Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität verloren.

Tabelle 7a: (4.7.2.)

% Glycerin anwesend	% Lubrol	meßbare Aktivität in % nach				Stunden
		0	24	48	72	
30	0,5	100	77	63	68	
41	0,5	100	100	68	65	
51	0,5	100	100	100	95	
41	0,5	100	100	68	65	
41	1,0	100	91	82	59	
41	2,0	100	100	100	100	
51	1,0	100	100	105	115	

Durch Erhöhung der Glycerin-Konzentration von 30% auf 51% kann die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität in Gegenwart von 0,5% Lubrol mindestens drei Tage lang erhalten bleiben. Wird die Glycerin-Konzentration mit 41% konstant gehalten, aber die Lubrol WX-Konzentration von 0,5% über 1% auf 2% erhöht, so bleibt die Steroid-5 α -Reduktion zu 100% auch noch nach drei Tagen erhalten. In einem Kontrollversuch setzten wir sowohl erhöhte Glycerin-Konzentration (51%) als auch 1% Lubrol ein. Wie nicht anders erwartet, bleibt hier die Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktase-Aktivität auf dem ursprünglichen Wert und steigt sogar noch auf 115% nach 72 Stunden.

EDTA hat keinen Einfluß auf die Stabilität der solubilisierten und zentrifugierten (144 000xg) Steroid-5 α -Reduktase, wie in einem Parallel-Experiment festgestellt wurde.

4.7.3. Stabilität der mit Lubrol WX solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase bei verschiedenen Wasserstoffionen-Konzentrationen

Wir titrierten den Überstand der 144 000xg Zentrifugation mit 0,36M NaOH bis zu pH 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5 und mit 0,36M H_3PO_4 zu dem pH 6,0, 5,5 und 5,0. Die Endkonzentrationen betrugen 36,4% Glycerin, 0,01M EDTA, 0,01 Kaliumzitrat, 1% Lubrol WX sowie 8,3mg Mikrosomenprotein/ml. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Stabilität der Steroid-5 α -Reduktase bei verschiedenen pH-Werten

pH-Wert	gemessene Aktivität in % der Ausgangsaktivität nach		
	0 Stunden	24 Stunden	96 Stunden
8,5	55,0	31,0	0
8,0	67,5	55,0	24,0
7,5	67,0	60,5	36,5
7,0	85,0	89,0	53,5
6,5	100,0	88,5	70,0
6,0	90,0	83,5	48,0
5,5	50,0	12,0	0
5,0	20,0	0	0

Für die Reinigung und Aufbewahrung der solubilisierten Steroid-5 α -Reduktase scheint pH 6,5 optimal zu sein. Nach 4 Tagen sind noch 70% der ursprünglichen Aktivität erhalten. Auch die pH-Werte 6,0 und 7,0 können verwendet werden, doch man muß dabei nach vier Tagen einen Verlust von etwa 50% der Ausgangs-Aktivität in Kauf nehmen. Bei höheren pH-Werten, z.B. 7,5, 8,0 etc. liegt die Anfangs-Aktivität schon 30% unter dem Wert bei pH 6,5; nach 24 Stunden fallen die Aktivitäten auf etwa 50%, nach 96 Stunden bis auf 0% ab.

4.7.4. Stabilität der mit Lubrol solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase nach weiterer Zugabe von Detergenzien

Zu dem 144 000xg Überstand der mit Lubrol solubilisierten Mikrosomen (nach 4.6.2.1.) fügten wir in einer Endkonzentration von 0,5% je Probe die Detergenzien Polyäthylenglycol 1500, 6 000, 20 000, Natriumdesoxycholat, Lensodel NP 80, Lensodel NP 40, Fettalkoholglycoläther, Triton X-114, Triton N-101, Triton X-100, Tween 20 hinzu.

Alle diese Detergenzien mit Ausnahme der drei Polyäthylenglycole haben eine unmittelbare inaktivierende Wirkung auf die Aktivität der Steroid-5 α -Reduktase. Direkt nach Zugabe der Detergenzien ist in allen diesen Fällen keine Steroid-Reduktion mehr meßbar. Nur im Falle des Polyäthylenglycols bleibt die Steroid-5 α -Reduktion in Höhe des Kontrollwertes. 24 Stunden nach Solubilisieren der Mikrosomen liegt der Kontrollwert bei 58%, die Aktivität der mit Polyäthylenglycol versehenen Proben bei 66% der ursprünglichen Aktivität. Nach 48 Stunden sind die Kontrolle und die Mikrosomen mit Polyäthylenglycol auf 48-50% gefallen. Der Einfluß von Polyäthylenglycol auf die Stabilität der solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase ist also kaum meßbar.

4.7.5. Stabilität der mit Lubrol solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase unter Ausschluß von Sauerstoff

Rattenleber-Mikrosomen wurden, wie unter 4.6.2.1. beschrieben, solubilisiert und nach 3.2.8. von Sauerstoff befreit. Wir maßen die Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktion als eine Funktion der Aufbe-

wahrungszeit. 30 Stunden nach Solubilisieren waren nur noch 72% der ursprünglichen Steroid-Reduktase-Aktivität vorhanden, nach 96 Stunden noch 48%. Im Vergleich mit der Kontrolle, die ebenso wie unter 3.2.8. beschrieben behandelt wurde, um vergleichbare Werte zu erhalten, liegen die Aktivitäten unter Sauerstoff-Ausschluß etwas höher (die Werte der Kontrolle sind 68% nach 30 Stunden und 41% nach 96 Stunden). Obwohl die Unterschiede nicht so groß erscheinen, müssen wir den hemmenden Effekt des Dithionits auf die Steroid-Reduktion berücksichtigen, der bis zu 20% bei dieser Konzentration beträgt. Die Kontrolle enthielt kein Dithionit.

4.8. Säulen-Chromatographie mit Cellulose-Ionenaustauscher

4.8.1. Bestimmung der optimalen Wasserstoffionen-Konzentration

4.8.1.1. DEAE-Cellulose-Säulen-Chromatographie bei pH 6,5

Wir bereiteten das Austauschermaterial sowie die Säule (100cm³) wie unter 3.2.6. beschrieben vor. Nach dem Packen der Säule und Äquilibrieren der DEAE-Cellulose mit 0,01M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5, 0,01M EDTA, 30% Glycerin, 0,5% Lubrol trugen wir auf die mit der Säurekomponente des Äquilibriumspuffers auf pH 6,5 eingestellten solubilisierten Mikrosomen (65ml, 1,0g Protein, 144 000xg Überstand) auf die Säule auf. Die 5ml-Fraktionen wurden mit Hilfe des optischen Testes auf NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität geprüft. Die gesamte Steroid-5 α -Reduktase wird von der DEAE-Cellulose nicht adsorbiert, sondern läuft vollständig durch die Säule und wird in der sogenannten Front-Fraktion gemessen. Die Ausbeute an Aktivität wurde mit Hilfe der INH-Methode bestimmt.

4.8.1.2. DEAE-Cellulose-Säulen-Chromatographie bei pH 7,0

Das Vorbereiten des Austauschermaterials, der Säule, sowie das Säulenvolumen entsprechen dem Punkt 3.2.6. Wir äquilibrierten die DEAE-Cellulose in 0,01M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 30% Glycerin, 0,5% Lubrol und 0,01M EDTA. Die solubilisierten Mikrosomen (65ml, 1,05mg Mikrosomenprotein, 144 000xg Überstand) wurden mit der Basenkomponente des Äquilibriumspuffers auf pH 7,0 eingestellt und anschließend auf die Säule aufgetragen. In den Fraktionen der Front befand sich keine NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-

Oxidoreduktase-Aktivität. Die Säule wurde dann mit 100ml Äquilibrationspuffer nachgewaschen. In dieser Waschflüssigkeit befanden sich auch keine Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität.

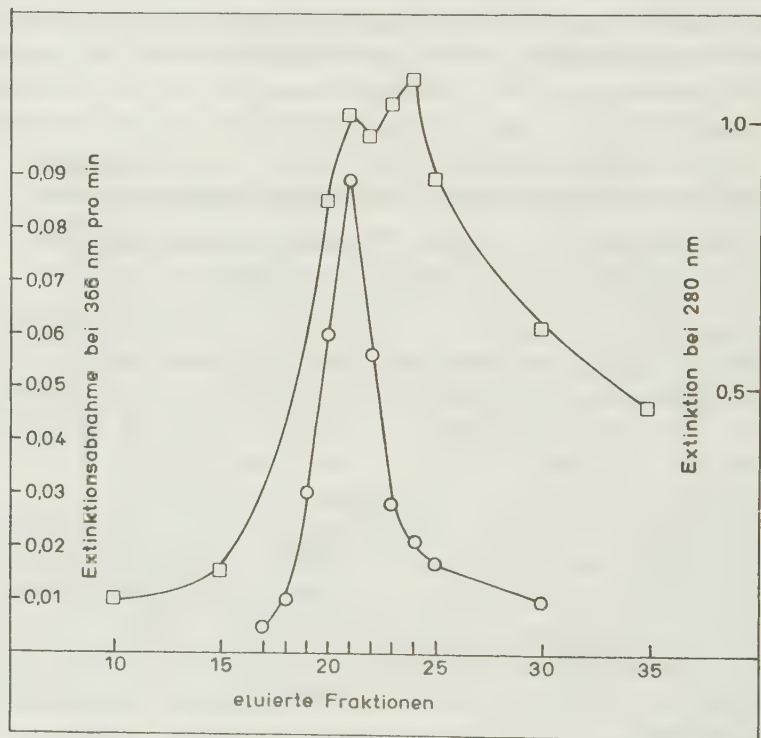


Abb. 26: DEAE-Cellulose-Chromatographie: Elutionsdiagramm nach 4.8.1.2. Die Steroid-5 α -Reduktase $\circ$ — $\circ$ wurde mit dem optischen Test, die Proteinverteilung $\square$ — $\square$ nach Warburg (50) gemessen.

Wir führten die Elution der an der DEAE-Cellulose adsorbierten Proteine mit dem Äquilibrationspuffer durch, der zusätzlich 1M KCl enthielt. Direkt nach Auftragen des Elutionspuffers löste sich eine gelb-braune Bande von der Matrix, die wir in 5ml-Fractionen auffingen. Die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivi-

tät war in den proteinhaltigen Fraktionen enthalten (Abb.26). Die Fraktionen Nr. 18 bis 25 enthielten eine spezifische Aktivität, die einem Reinigungsfaktor von 4 entspricht, sowie eine Ausbeute von 70 bis 80%.

4.8.1.3. DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 7,7

Das Packen der Säule und das Äquilibrieren des Ionenaustauscher-Materials besprachen wir unter 3.2.6. Der pH-Wert der solubilisierten Mikrosomen wurde, wie schon besprochen, auf pH 7,7 eingestellt. Nach dem Auftragen der Mikrosomen-Lösung (65ml, 1,05mg Mikrosomenprotein, 144 000xg Überstand) wuschen wir die Säule mit Äquilibrationspuffer pH 7,7 nach. Weder in der Front-Fraktion noch in dem Wasch-Puffer war eine Steroid-5 α -Reduktion meßbar. Durch Elution mit 0,01M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7, 30% Glycerin, 0,5% Lubrol, 1M KCl, 0,01M EDTA konnte eine gelb-braune Bande vom Kopf der DEAE-Cellulose-Säule abgelöst werden, die wir auf enzymatische Aktivität testeten. Durch den optischen Test stellten wir fest, daß die eluierten Fraktionen die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase enthielten. Die Ausbeute beträgt 10%, wie später mit Hilfe des INH-Testes festgestellt wurde.

4.8.1.4. CM-Cellulose-Chromatographie bei pH 6,5

Wir führten das Experiment wie unter 3.2.6. beschrieben durch. Weder in der Front-Fraktion noch in den mit 0,01M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5, 30% Glycerin, 0,5% Lubrol, 0,01M EDTA, 1M KCl eluierten Fraktionen konnte eine meßbare NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktion festgestellt werden.

4.8.2. Der Einfluß von EDTA auf die Stabilität der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase bei der DEAE-Cellulose-Chromatographie

Durch zwei Parallel-Experimente, die in der gleichen Weise wie unter 4.8.1.2. beschrieben durchgeführt wurden, sollte der Einfluß von EDTA auf die Stabilität der Steroid-5 α -Reduktase bei ihrer Reinigung festgestellt werden. Einmal war beim Äquilibrieren der Säule, Solubilisieren der Mikrosomen, Nachwaschen der Säule und Eluieren der solubilisierten Mikrosomen zu jeder Zeit 0,01M EDTA

anwesend, bei dem anderen Experiment nicht.

In Gegenwart von EDTA werden Resultate von 4.8.1.2. genau reproduziert. Ist kein EDTA anwesend, so kann weder in der Front-Fraktion noch in der eluierten Fraktion eine NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase festgestellt werden.

4.8.3. TEAE-Cellulose-Chromatographie der solubilisierten Mikrosomen

Durch Verwendung von TEAE-Cellulose wurden die gleichen Ergebnisse erhalten wie mit DEAE-Cellulose (4.8.1.1. bis 4.8.1.3.).

4.8.4. DEAE-Cellulose-Chromatographie mit erhöhten Glycerin-Konzentrationen

Die unter den Punkten 4.8.1.2. beschriebenen Experimente führten wir mit 40% bzw. 50% Glycerin beim Solubilisieren und Äquilibrieren der DEAE-Cellulose durch, um eine höhere Stabilität der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase zu erhalten. Durch den hohen Glyceringehalt können die solubilisierten Mikrosomen und speziell die Steroid-5 α -Reduktase an der DEAE-Cellulose nicht adsorbiert werden. Weder bei pH 7,0 noch bei pH 7,7 wurde die Steroid-5 α -Reduktase beim Durchfließen der DEAE-Cellulose zurückgehalten. In beiden Fällen enthält die Front-Fraktion mit 90 bis 100% Ausbeute die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität.

4.9. Ammoniumsulfat-Fraktionierung der solubilisierten Mikrosomen

Wir führten die Fraktionierung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, wie unter 3.2.7. beschrieben durch. In der Tabelle 9 sind die Ergebnisse aufgeführt, die sich bei einer Fraktionierung von 0-25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ergeben.

Die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität im Flotat der 0-25% Ammoniumsulfat-Fraktionierung entspricht einem Anreicherungsfaktor von 3,6. Die Ausbeute beträgt 68%. Der 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Überstand enthält weniger als 2% der Steroid-5 α -Reduktase.

Tabelle 9:

Fraktion	Volumen (ml)	mg Prot. /ml	Aktivität $\mu\text{M Test. red.}/\text{min ml}$	spez. Aktivität	Ausbeute	Anreicherung
Original-Mikrosomen	10	32	0,4	0,0125	100%	1
solubilis. Mikrosomen	24	13,1	0,182	0,0137	110%	1,1
0-25% Amm.-sulfat-Flot.	8	8,2	0,370	0,045	68%	3,6

Als eine Variante der Ammoniumsulfat-Fraktionierung sättigten wir die solubilisierten Mikrosomen (144 000 Überstand) mit 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, den daraus resultierenden Überstand dann mit 30% Ammoniumsulfat. Die Tabelle 10 gibt über die Ergebnisse Auskunft.

Tabelle 10:

Fraktion	Vol. (ml)	Aktivität $\mu\text{M Test. red.}/\text{min ml}$	spez. Aktivität	mg Prot. /ml	Anreicherung	Ausbeute
Original-Mikrosomen	10	0,246	0,0077	32	1	100%
solubilis. Mikrosomen 144 000xg	23	0,142	0,0102	13,9	1,33	134%
20-30% Ammonium-sulf.-Flotat	5	0,371	0,0339	8,0	4,4	69%

Durch eine Fraktionierung der solubilisierten Mikrosomen (144 000xg Überstand) von 0 bis 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und dann von 20 bis 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kann eine Reinigung der NADPH: Δ^4 -5-Ketosteroid-Oxidoreduktase erzielt werden, die einem Faktor von 4,4 entspricht. Dieser Faktor bezieht sich auf eine Ausbeute von 69%. In einem Parallel-Experiment, in welchem der Überstand der 144 000xg der solubilisierten Mikrosomen mit 30% Ammoniumsulfat die gleiche Zeit aufbewahrt wurde, in welcher wir die Fraktionierung der solubilisierten Mikrosomen zuerst von 0 bis 20% und dann von 20 bis 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durchführten, verlor die Steroid-5 α -

Reduktase 30% ihrer Aktivität.

4.10. Reinigung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase mit Hilfe der DEAE-Cellulose-Chromatographie und anschließender Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Wir führten eine DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 7,0 durch, wie sie schon unter 4.8.1.2. beschrieben wurde. Die Fraktionen, die 70% der gesamten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität ausmachten, wurden vereinigt und anschließend einer weiteren Reinigung mit Ammoniumsulfat unterzogen. Durch die Fraktionierung von 0 bis 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entfernten wir einen großen Teil der Begleitproteine, durch die anschließende Fraktionierung von 20 bis 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fällten wir die Steroid-5 α -Reduktase aus. Die Resultate sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Reinigung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase

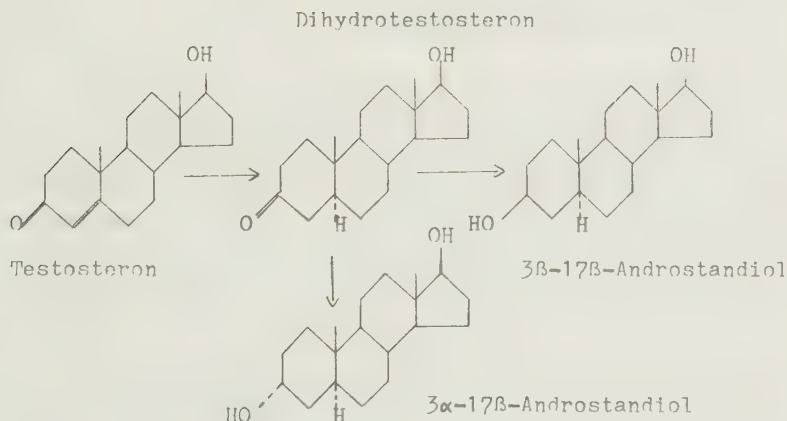
Fraktion	Vol. (ml)	Aktivität μM Test, red./min ml	spez. Akti- vität	mg Prot. /ml	Anrei- cherung	Aus- beute
Original- Mikrosomen	35	0,334	0,0104	32	1	100%
solubilis. Mikrosomen 144 000xg	64	0,199	0,0146	13,6	1,40	109%
DEAE-Cell. gepoolte Fraktionen	35	0,274	0,0413	6,5	3,97	82%
20-30% Ammonium- sulfat- Flotat	8	0,820	0,175	4,68	16,8	56%

Mit Hilfe der DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 7,0 sowie anschließender Ammoniumsulfat-Fraktionierung von 20 bis 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gelingt es, die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase etwa 16-fach anzureichern. Die Ausbeute beträgt dabei 56%. Den größten Aktivitätsverlust erhalten wir bei der Inaktivierung der Steroid-5 α -Reduktase durch Ammoniumsulfat.

5. Diskussion

=====

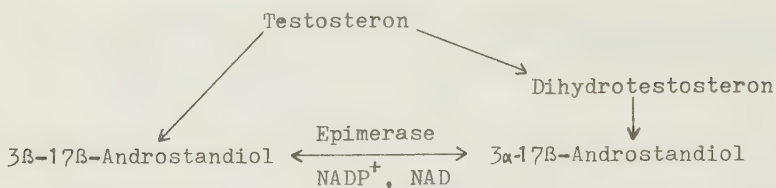
Über die Reaktionsfolge der Testosteron-Reduktion zu Dihydrotestosteron und Androstandiol



Die Steroid-5α-Reduktasen und 3-OH-Steroid-Dehydrogenasen sind oft Gegenstand experimenteller Bearbeitung gewesen (11, 39, 40), ohne daß sie jedoch in ihrem Zusammenwirken besprochen wurden. Dazu trägt die Uneinheitlichkeit in der Literatur, insbesondere über die Entstehung der beiden Androstadiol-Steroide, bei. Z. B. berichten SCHRIEFERS et al. 1964 (37), daß die Rattenleber (♀ Ratten) nur eine 3β-OH-Steroid-Dehydrogenase (mit Cortisol als Substrat) enthält, 1967 (102) aber, daß nur 3α-17β-Androstadiol bei der mikrosomalen (♀ Rattenleber) Reduktion von Testosteron auftritt. Ähnliche Widersprüche treten auch in Arbeiten anderer Laboratorien auf (38 - 42).

Aufgrund unserer Experimente vermuten wir (siehe unter 4.1. und 4.2.), daß 3α-17β-Androstadiol und 3β-17β-Androstadiol in Lebermikrosomen der weiblichen Ratte auf verschiedene Weise entstehen, wobei der Weg über Dihydrotestosteron, zumindest im Fall des 3β-17β-Androstadiols, nicht obligatorisch zu sein scheint.

Wir schlagen folgendes Schema vor:



Dieser Vorschlag basiert auf folgenden Beobachtungen: 3β-17β-Androstadiol entsteht nicht in größeren Mengen aus Dihydrotestosteron in Gegenwart von NADPH und Mikrosomen. Mit 3β-17β-Androstadiol und NADP⁺ oder NAD⁺ konnte in keinem Fall Dihydrotestosteron als entstandenes Produkt beobachtet werden. Eine Reaktion von Testosteron zu 3β-17β-Androstadiol oder umgekehrt kann also nicht über Dihydrotestosteron ablaufen, welches man sonst in den Ätherextrakten gefunden haben müßte. Die Annahme, daß die Reaktion Dihydrotestosteron→3β-17β-Androstadiol irreversibel ist, und deswegen das Zwischenprodukt nicht auftritt, ist unwahrscheinlich, da die Reaktion vom 3α-17β-Androstadiol zum Dihydrotestosteron reversibel abläuft. Die gegenseitige Wechselbeziehung zwischen den Produkten der mikrosomalen Testosteron-Reduktion, den Steroiden Dihydrotestosteron und 3α-17β-Androstadiol spricht auch gegen die Annahme einer irreversiblen Reaktion zwischen Dihydrotestosteron und 3β-17β-Androstadiol. Die Abhängigkeit des Entstehens von 3α-17β-Androstadiol von der vorhandenen Konzentration an Dihydrotestosteron spricht für die Annahme zweier aufeinanderfolgender Enzyme oder Enzymsysteme. Ist z.B. die 3α-OH-Steroid-Dehydrogenase im Vergleich zur 5α-Steroid-Reduktase sehr aktiv, so wird mehr Dihydrotestosteron umgesetzt. Ist sie relativ inaktiv, so beobachten wir höhere Dihydrotestosteron- und niedrigere 3α-17β-Androstadiol-Konzentrationen. Würde auch die Reduktion von Testosteron zu 3β-17β-Androstadiol über Dihydrotestosteron ablaufen, so wäre obige Abhängigkeit nicht so eindeutig, sondern würde durch Bildung von 3β-17β-Androstadiol aus Dihydrotestosteron verwischt werden. Außerdem waren die entstandenen Mengen von 3β-17β-Androstadiol immer unabhängig von der gefundenen Konzentration an Dihydrotestosteron.

In unseren Experimenten fanden wir sowohl NADP^+ als auch NAD^+ als Wasserstoffakzeptoren wirksam bei der 3α - 17β -Androstadiol-Dehydrogenase-Aktivität. BASSHAM et al. (81) sowie REPKE et al. (40) berichten zwar, daß NAD^+ der alleinige Co-Faktor bei der Steroid- 3α -OH-Dehydrogenierung sein soll, aber die Unstimmigkeiten zu unseren Ergebnissen beruhen nicht auf Unterschieden in den verwendeten Puffersystemen, da auch in Tris-HCl pH 7,0 Dihydrotestosteron aus 3α - 17β -Androstadiol in Gegenwart von NAD^+ entsteht (34).

Für die Unstimmigkeiten, die bezüglich des Auftretens der beiden Androstadiol-Steroide in der Literatur auftreten, haben wir keine Erklärung. Obwohl TAYLOR (82) und einige andere (41) bei der mikrosomalen Reduktion von Testosteron kein 3β - 17β -Androstadiol finden, trat es bei uns ständig und mit hohen Konzentrationen auf. Ähnliche Befunde wie die unsrigen werden von SCHRIEFERS et al. berichtet (37).

Über die an dem mikrosomalen Elektronentransport vom NADPH auf Testosteron zur Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktion beteiligten Faktoren

In den letzten Jahren hat man bei Untersuchungen über die $\text{NADPH}:\Delta^4$ -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase wenig Wert auf die Diskussion ihrer Struktur gelegt. Bis auf wenige Ansätze (33) ist über die an der Steroid-Reduktion beteiligten Faktoren nur wenig bekannt geworden.

Allgemein bestand in der Literatur die Auffassung, daß es sich bei der $\text{NADPH}:\Delta^4$ -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase um ein Enzym handelt, welches die Elektronen vom NADPH auf Testosteron überträgt (11) und nicht um ein Enzymsystem.

Über die Teilnahme von FAD oder FMN an der Steroid- 5α -Reduktion wurden Vermutungen angestellt, aber kein Hinweis dafür gefunden (33).

Durch Hemmstoffversuche erhielten wir deutliche Hinweise darauf, daß verschiedene Faktoren an dem mikrosomalen Elektronentransport

von NADPH auf Testosteron beteiligt sind. 2,4-Dinitrophenol, Pentachlorophenol, Atebrin und TTA hemmen alle die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase. 2,4-Dinitrophenol ist bekannt als ein Entkoppler der Atmungskette (83, 84), aber auch als ein Inhibitor von Chinon-Reduktasen (85, 86). Ähnliches gilt für Pentachlorophenol (87). Atebrin ist auch bekannt als ein Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette (88) und als ein Hemmstoff von einigen Flavoproteinen (89). Thenoyltrifluoracetone soll den Elektronenübergang von Flavoproteinen auf Coenzym Q hemmen (90). In unseren Experimenten fiel auf, daß durch die vier Hemmstoffe nicht nur die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase, sondern auch der sogenannte "Leerschleich" inhibiert wird.

Die oben erwähnten Eigenschaften der Hemmstoffe weisen auf die Teilnahme eines Flavoproteins (Hemmung durch TTA, Atebrin) und möglicherweise eines Proteins mit einem Chinon als Cofaktor (Hemmung durch 2,4-Dinitrophenol, Pentachlorophenol, TTA) bei dem mikrosomalen Elektronentransport von NADPH auf Testosteron hin. Nach dem Vergleich der Redoxpotentiale (ox/red) von Riboflavin (-0,21 Volt) und Ubichinon (+0,1 Volt) müssen die Elektronen von dem NADPH (-0,32 Volt) über das Flavinprotein auf das Chinon übertragen werden. Dafür spricht auch der nicht-kompetitive Charakter der Atebrin-Hemmung in Bezug auf Testosteron. Wir erhalten eine nicht-kompetitive Hemmung, wenn die Bindung des Substrates an das Enzym durch den Inhibitor nicht beeinflußt und die maximale Geschwindigkeit $V_{\max}$ erniedrigt wird. Dieser Fall tritt bei einer räumlichen Trennung des Enzyms (die Steroid-5 α -Reduktase, welche mit dem Substrat - Testosteron - reagiert) von der Bindungsstelle des Inhibitors (Flavoprotein) ein.

Bei der Suche nach dem Flavoprotein muß man sich mit der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase (E.C. 1.6.99.3) befassen. Nicht nur die Tatsache, daß der sogenannte Leerschleich, der unter anderem die mikrosomale Reduktion endogener Substrate, z.B. Lipide oder Sauerstoff via der NADPH: Cytochrom c-Reduktase charakterisiert (91), durch die obigen Hemmstoffe inhibiert wird, sondern auch der Befund, daß bevorzugt NADPH als Wasserstoffdonator zur Reduktion von Testosteron verwendet wird, deuten auf die Teilnahme der NADPH: Cytochrom-c-Oxidoreduktase an dieser Reaktion hin.

Eine starke Unterstützung erfährt diese Hypothese durch die Hemmeffekte von Gallussäure-Propylester auf die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase. Von TORIELLI und SLATER (65) als ein charakteristischer und typischer Hemmstoff der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase bezeichnet, kann er nur solche Reaktionen hemmen, an denen auch dieses Enzym beteiligt ist. Da Gallussäure-Propylester die Steroid-5 α -Reduktase, auch wenn diese solubilisiert ist, hemmt, muß die NADPH: Cytochrom c-Reduktase an der Hydrogenierung von Testosteron beteiligt sein.

Auch die Ergebnisse der Zwei-Substrate-Kinetik weisen auf die Richtigkeit obiger Hypothese hin. Die Tatsache, daß mit Vitamin K₃ und Cytochrom c als schnell umgesetzten Substraten auf der einen Seite und Testosteron als langsam reduziertes Substrat auf der anderen Seite die Substrat-Sättigungskurven (Menadion oder Cytochrom c alleine und dann in Gegenwart einer konstanten Menge von Testosteron) einen charakteristischen Schnittpunkt zeigen, der für beide Kombinationen etwa bei 0,02M Vitamin K₃ oder Cytochrom c/0,3mg Mikrosomenprotein liegt, ist ein sicherer Beweis für die Teilnahme der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase an der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktion.

Es ist in der Literatur hinreichend bekannt, daß die mikrosomale NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase und die NADPH: Vitamin K₃-Oxidoreduktase miteinander identisch sind (92). DCPIP wird zwar auch von der gereinigten NADPH: Cytochrom c-Reduktase reduziert (93), aber nach unseren Experimenten kann die NADPH: DCPIP-Reduktase nicht mit der NADPH: Cytochrom c-Reduktase identisch sein. Es sprechen zwei Punkte dagegen. Zwei-Substrate-Kinetik mit DCPIP allein und DCPIP in Gegenwart von Testosteron ergeben Substrat-Sättigungskurven, die sich nicht überschneiden. Die NADPH-Oxidation ist in Gegenwart von DCPIP und Testosteron immer größer als mit DCPIP allein. Die mit Lubrol solubilisierte NADPH: Cytochrom c-Reduktase läßt sich von der NADPH: DCPIP-Reduktase durch Ammoniumsulfat-Fällung trennen.

Atebrin weist eine Flavin-ähnliche Struktur auf und ist dadurch in der Lage, mit dem FAD oder FMN um das Protein in Konkurrenz zu treten (94). Die Hemmung von Atebrin in Bezug auf die Reduktion

von Menadion muß daher nicht-kompetitiver Natur sein, wie sich auch herausgestellt hat.

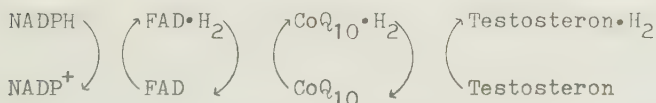
2,4-Dinitrophenol und TTA hemmen zwar auch die mikrosomale Reduktion von Vitamin K_3 und Cytochrom c (mit NADPH), aber der Angriffspunkt dieser beiden Inhibitoren, zumindest vom TTA, liegt nicht bei dem Elektronenübergang vom NADPH zum FAD, sondern bei dem Elektronentransport vom FAD auf den darauffolgenden Akzeptor (90). Die Natur der Hemmung von TTA ($FAD \rightarrow CoQ$) weist auf die Teilnahme von Coenzym Q oder seinen Derivaten an der mikrosomalen Steroid- 5α -Reduktase hin. Obwohl bislang keine Funktion für Coenzym Q in Mikrosomen gefunden wurde, konnte es doch in Rattenleber-Mikrosomen (95, 96) und in der Kernfraktion von Leberzellen nachgewiesen werden. Allerdings weisen neuere Untersuchungen darauf hin, daß die in den Mikrosomen vorgefundene hohe Konzentration an Coenzym Q möglicherweise zum Teil aus dem Golgi-Apparat stammt (100). Wenn Coenzym Q an dem Elektronentransport von NADPH auf Testosteron teilnimmt, müßte man in der Lage sein, mit Einsatz von Mikrosomen und reduziertem Coenzym Q Testosteron reduzieren zu können. Während Vitamin K_3 , K_1 oder Menadionbisulfit keinen Hinweis auf eine Funktion an der $NADPH: \Delta^4-3$ -Ketosteroid-Oxidoreduktion geben, entsteht mit Coenzym $Q_6 \cdot H_2$ oder Coenzym $Q_{10} \cdot H_2$ tatsächlich Dihydrotestosteron und Androstandiol aus Testosteron. Coenzym $Q_6 \cdot H_2$ scheint aber offensichtlich nicht optimal als Elektronendonator für die Steroid-Reduktion zu sein, denn durch Zusatz von Phospholipiden (Asolectin) konnten wir die Testosteron-Reduktion ganz beträchtlich steigern. 0,066mM Coenzym Q/4,5mg Mikrosomenprotein ergeben dabei eine optimale Reduktionsrate von Testosteron. Als Produkte bei der mikrosomalen Testosteron-Hydrogenierung mit reduziertem Coenzym Q_6 oder Coenzym Q_{10} stellten wir Dihydrotestosteron, 3β - 17β -Androstandiol und 3α - 17β -Androstandiol fest. Hierbei ist interessant, daß die schon oben beschriebene Abhängigkeit zwischen 3α - 17β -Androstandiol und Dihydrotestosteron wiederum auftritt, ein weiterer Beweis für unterschiedliche Entstehungswege von 3β - 17β -Androstandiol und 3α - 17β -Androstandiol.

Coenzym Q_6 und Q_{10} werden beide in Gegenwart von NADPH durch Rattenleber-Mikrosomen reduziert. Da die mikrosomale Reduktion von

Testosteron mit NADPH durch Zusatz von Coenzym Q_6 , Q_{10} oder Vitamin K_3 nicht gesteigert werden kann, ist die Konzentration des in den Mikrosomen vorliegenden Chinons für die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Reduktion nicht geschwindigkeitsbestimmend. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß die Reaktion in Phosphat-Puffer abläuft, denn in Tris-HCl-Puffer wird durch Zusatz von Vitamin K_3 eine Aktivierung auf die Testosteron-Reduktion festgestellt. Im Tris-HCl-Puffer scheint ein Inhibitor vorhanden zu sein, der auch die Verwendung von NADH als Wasserstoffdonator verbietet (34).

Als Resultat unserer Experimente können wir folgendes Schema angeben:

Die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase



NADPH überträgt 2 Elektronen auf das FAD der NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase. Von dort werden die Elektronen weitergeleitet auf das Chinon. Die Steroid-5 α -Reduktase schließlich reduziert Testosteron, indem es die Elektronen vom CoQ_{10} empfängt.

Obwohl MASTERS et al. (97) und KAMIN et al. (98) beobachteten, daß die NADPH Cytochrom c-Reduktase zwischen der voll- $(\text{FAD} \cdot \text{H}_2)$ und halb-reduzierten Form $(\text{FAD} \cdot \text{H})$ cyclisiert und dabei je ein Elektron auf Elektronenakzeptoren, z.B. Chinone, überträgt (92), können wir bei der Reduktion der Δ^4 -Doppelbindung im Testosteron keine Ein-Elektronen-Übertragung annehmen. Es ist jedoch möglich, daß noch weitere Faktoren zwischen Coenzym Q und Testosteron oder zwischen FAD und Coenzym Q vorhanden sind, denn wir können auf Grund unserer Hemmversuche (TTA, Atebrin und 2,4-Dinitrophenol hemmen die Steroid-5 α -Reduktase und die NADPH: Cytochrom c-Reduktase, Pentachlorophenol hemmt nur die Steroid-5 α -Reduktase) nicht ausschließen, daß evtl. noch weitere Elektronen-Mediatoren außer CoQ und FAD existieren. Bisher ist es noch ungeklärt, auf welche Weise von dem zwischen der nicht- und halb-reduzierten Form cyclisierenden CoQ zwei Elektronen auf Testosteron übertragen

werden. Möglicherweise müssen wir zwei CoQ pro Testosteron annehmen; die mikrosomale Reduktion von Sauerstoff zu H_2O_2 mit Hilfe der NADPH: Cytochrom c-Reduktase und Vitamin K_3 lassen auch zwei Mole Semichinon pro Mol Sauerstoff annehmen.

Ein Miniatur-Elektronentransport in der Form der Aldehyd-Oxidase (99), welcher Flavin, Non-Heme-Iron, Molybdän und CoQ in einem Enzym enthält, scheint durch die Hemmwirkung von Pentachlorophenol ausgeschlossen, aber nicht unmöglich, d.h. der Elektronentransport vom NADPH auf Testosteron kann möglicherweise auch durch nur ein Enzym katalysiert werden.

Über die Reinigung und Anreicherung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase

Eine endgültige Angabe, welche Faktoren an der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase beteiligt sind, wird sich erst machen lassen, wenn es gelingt, diese einzelnen Faktoren nach Solubilisierung zu trennen und anschließend durch Rekombination wieder die volle biologische Aktivität zu erhalten. Die Reinigung der Steroid-5 α -Reduktase ist jedoch nicht durchführbar ohne eine gewisse Kenntnis der Art und Anzahl der Faktoren, da die Reinigung ja immer an das Messen der enzymatischen Aktivität gebunden ist.

Der erste Schritt bei der Reinigung membrangebundener Enzyme ist die erfolgreiche Solubilisierung der Proteine. Da die Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase aus der Rattenleber mit organischen Lösungsmitteln, z.B. Aceton oder n-Butanol jedesmal zu einer Inaktivierung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase führt, wendeten wir sogenannte Lösungsvermittler an.

Das Beschallen der Mikrosomen unter den geeigneten Umständen (mit Asolectin) brach das Endoplasmatische Retikulum in hinreichend kleine Membranstücke, so daß die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase im 144 000xg Überstand erhalten werden konnte. Es ist interessant, daß Eilecithin offensichtlich einen Faktor enthält, welcher das Enzym inaktiviert. Offensichtlich spielen Phospholipide bei der Erhaltung der enzymatischen Aktivität der Steroid-5 α -Reduktase eine gewisse Rolle. Diese Phospholipide müssen im Asolectin enthalten sein. Eine routinemäßige Anwendung dieser

Methode zur Reinigung der Steroid-5 α -Reduktase ist aber wegen der geringen Stabilität der Phospholipid-Micellen in wässriger Lösung nicht angebracht.

Lösungsvermittler auf der Basis von Detergenzien lassen sich für eine Reinigung von membrangebundenen Enzymen gut verwenden (74). Ohne Anwendung von Stabilisatoren der enzymatischen Aktivität oder anderer Effektoren gelang es uns jedoch nicht, die NADPH:

Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase aktiv in Lösung zu bringen. Alle üblichen Detergenzien, z.B. Natrium-Desoxycholat, Lubrol, Tween 20 etc. inaktivierten das Enzym. Nicht unerwartet aber ist der stabilisierende Einfluß von hohen Glycerin-Konzentrationen (30%) auf die Steroid-5 α -Reduktase in Gegenwart von Detergenzien. Andere mikrosomale Enzyme, z.B. das Cytochrom P₄₅₀ (78), können durch Glycerin in Gegenwart von Detergenzien stabil gehalten werden. Während die meisten Detergenzien die Steroid-5 α -Reduktase auch in Gegenwart von Glycerin (30%) inaktivieren, bleibt die Aktivität mit den Detergenzien Lubrol WX und Tween 20 erhalten. Allerdings wird die Steroid-Reduktion in dem Sediment der 144 000xg Zentrifugation gemessen; sie ist also nicht echt gelöst. Erst durch Zugabe von Natrium-Zitrat zu Glycerin, Lubrol oder Tween 20 und Mikrosomen wird die Steroid-5 α -Reduktase in Lösung gebracht und die Aktivität im 144 000xg Überstand gemessen. Wir können keine Erklärung dafür finden, warum das Natrium-Zitrat einen katalysierenden Effekt auf die Solubilisierung der NADPH:

Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase durch die Detergenzien Lubrol WX und Tween 20 ausübt. Die optimale Natrium-Zitrat-Konzentration für die Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase beträgt unter den angegebenen Versuchsbedingungen 0,1M. Höhere oder niedrigere Konzentrationen führen zu einer verminderten Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase. Zugabe von KCl zu Natrium-Zitrat, Glycerin, Lubrol oder Tween 20 und Mikrosomen ergibt eine weitere Solubilisierung der Steroid-5 α -Reduktase in dem 144 000xg Überstand. Möglicherweise liegt hier eine Aktivierung der NADPH: Cytochrom c-Reduktase vor (79).

Das Problem der Anreicherung der solubilisierten NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase ist z.T. ein Problem der Stabilität des Enzyms. Durch Steigerung der Glycerin-Konzentration von 30%

auf 50% oder der Lubrol-Konzentration von 1% auf 2% bleibt die Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität auch über mehrere Tage erhalten. Allerdings werden durch die hohen Glycerin- oder Detergenz-Gehalte die geladenen Gruppen an der Steroid-5 α -Reduktase abgeschirmt, so daß eine Trennung des Enzyms von anderen Proteinen durch Cellulose-Ionenaustauscher-Chromatographie nicht mehr möglich ist. Das Enzym wird nicht mehr an die geladenen Cellulose-Partikel adsorbiert. Ein Erhöhen oder Erniedrigen der Wasserstoffionen-Konzentration des Puffers zur Chromatographie zur Verstärkung der geladenen Gruppen des Enzyms erhöht die Inaktivierung der Steroid-5 α -Reduktase. Der optimale pH-Wert für die DEAE-Cellulose-Chromatographie wäre pH 6,5. Bei höheren oder niedrigeren Wasserstoffionen-Konzentrationen wird die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase sehr viel schneller inaktiviert als bei pH 6,5. Zur weiteren Anreicherung der Steroid-5 α -Reduktase schlossen wir einen Kompromiß. Die DEAE-Cellulose-Chromatographie wurde bei pH 7,0 und einer Glycerin- und Lubrol-Konzentration von 30% bzw. 0,5% durchgeführt. Dabei nehmen wir eine gewisse Inaktivierung des Enzyms in Kauf, die aber in vertretbaren Grenzen bleibt, wenn die Chromatographie innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden kann.

EDTA muß zur Erhaltung der Aktivität der Steroid-5 α -Reduktase während der Chromatographie vorhanden sein, während es zum Aufbewahren von solubilisierten Mikrosomen nicht erforderlich ist. Dies deutet auf eine Empfindlichkeit der Steroid-5 α -Reduktase gegenüber Schwermetallen hin, die möglicherweise in der DEAE-Cellulose und in den großen Mengen an verwendetem Puffer zur Chromatographie vermehrt vorhanden sind

Die von der DEAE-Cellulose-Chromatographie erhaltenen (durch 1M KCl-Elution) Fraktionen mit NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität wurden vereinigt und durch 20 bis 30% (NH₄)₂SO₄ fraktioniert. Durch diese beiden Reinigungsschritte wird die NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase 16-fach angereichert, und die Ausbeute beträgt dabei 56%. Die Anwendung eines Salz-Gradienten zur Elution der Steroid-5 α -Reduktase von der DEAE-Cellulose brachte bisher keine relevanten Ergebnisse. Alle daraus erhaltenen Fraktionen besaßen keine Steroid-5 α -Reduktase-Aktivität mehr. Eine Rekombination der Fraktionen ohne genaue Kenntnis der Anzahl und Lokali-

sierung der Faktoren war nicht durchführbar. Die Rekombination aller Faktoren miteinander verdünnte die Enzym-Lösung zu sehr, so daß keine signifikante NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität gemessen werden konnte.

6. Zusammenfassung

=====

- 1.) Bisher war nicht bekannt, welche Faktoren am Elektronenübergang vom NADPH auf Testosteron beteiligt sind. Durch die vorliegenden Versuche konnte gezeigt werden, daß die Elektronen vom NADPH über die NADPH: Cytochrom c-Oxidoreduktase und einem CoQ-Derivat, wahrscheinlich CoQ₁₀, auf Testosteron übertragen werden.
- 2.) Bisher wurde angenommen, daß bei der Reduktion des Testosterons zunächst 5 α -Dihydrotestosteron entsteht, aus dem durch Reduktion der 3-Ketogruppe sowohl 3 α -als auch 3 β -17 β -Androstandiol gebildet werden. Durch unsere Untersuchungen konnte aber gezeigt werden, daß nur das 3 α -ol-Steroid aus Testosteron über Dihydrotestosteron entsteht, während bei der Bildung von 3 β -17 β -Androstandiol Dihydrotestosteron nicht als gemeinsames Zwischenprodukt auftritt. Dies deutet auf einen unterschiedlichen Reduktionsweg.
- 3.) Umfangreiche Versuche von verschiedenen Arbeitsgruppen haben bislang nicht zu einer Solubilisierung der NADPH: Δ^4 -3-Ketosteroid-Oxidoreduktase geführt. Uns ist diese Solubilisierung nun erstmalig gelungen
 - a) durch Beschallen der Mikrosomen in Gegenwart von Asolectin. Der Reinigungsfaktor beträgt etwa 4, die Ausbeute 70%,
 - b) durch einen Detergenz-Aufschluß. In Gegenwart von 30% Glycerin, 0,5% Lubrol WX oder Tween 20 und 0,1M Natrium-Zitrat wird die Steroid-5 α -Reduktase solubilisiert. Durch zwei weitere Reinigungsschritte (DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 7,0 und Ammoniumsulfat-Fraktionierung von 20 bis 30% (NH₄)₂SO₄) kann die Steroid-5 α -Reduktase 16-fach angereichert werden mit einer Ausbeute von 56%.

7. Literaturverzeichnis

=====

- 1.) Westphal, V., Z. Physiol.Chem. 273, 13 (1942)
- 2.) Cuyler, W.K., Ashley, C., Hamblen, E.C., Endocrinology 27, 177 (1940)
- 3.) Forichelli, E., Dorfman, R., J. Biol.Chem. 233, 443 (1956)
- 4.) Nduaguba, J.C., Clark, A.F., Can. J. Biochem. 49, 385 (1971)
- 5.) Mc Guire, J.S., Dorfman, G.M., Arch. Biochem. Biophys. 82, 476 (1959)
- 6.) Moore, R.J., Wilson, J.D., J. Biol. Chem. 247, 958 (1972)
- 7.) Voigt, W., Fernandez, E.P., Hsia, S.L., J. Biol. Chem. 245, 5594 (1970)
- 8.) Nimrod, A., Lindner, H.R., Biochem. Biophys. Acta 261, 291 (1972)
- 9.) Brown-Grant, K., Forichelli, E., Dorfman, R., J. Biol. Chem. 235, 1317 (1960)
- 10.) Schneider, J.J., Horstman, P.M., J. Biol. Chem. 191, 327 (1951)
- 11.) Engel, L.L., Langer, J.J., Ann. Rev. Biochem. 30, 499 (1961)
- 12.) Leybold, K., Staudinger, H., Biochem. Zeitschr. 331, 399 (1959)
- 13.) Schriefers, H., Ghraf, R., Schmidt, H., Z. Physiol. Chem. 353, 378 (1973)
- 14.) Gold, E.M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 103, 829 (1960)
- 15.) Tomkins, G.M., Mc Guire, J.S., J. Biol. Chem. 235, 1634 (1960)
- 16.) Tomkins, G.M., Ann. N.Y. Acad. Sci. 82, 836 (1959)
- 17.) Peterson, R.E., J. Clin. Invest. 39, 320 (1960)
- 18.) Forichelli, E., Brown-Grant, K., Dorfman, R., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 99, 594 (1958)
- 19.) Leybold, K., Staudinger, H., Biochem. Zeitschr. 331, 389 (1959)
- 20.) Yates, F.E., Herbst, A.L., Urquhart, J., Endocrinology 63, 887 (1958)
- 21.) Schriefers, H., Ghraf, R., Hoff, H.G., Ockenfels, H., Z. Physiol. Chem. 352, 1363 (1971)
- 22.) Hagen, A.A., Troop, R.C., Endocrinology 67, 194 (1960)
- 23.) Kato, R., Onoda, K-J., Omori, Y., Endocrinology Japon. 12, 215 (1970)

- 24.) Urquhart, J., Yates, F.E., Herbst, A.L., Endocrinology 64, 816 (1959)
- 25.) Mc.Guire, J.S., Tomkins, G.M., J. Biol. Chem. 234, 791 (1959)
- 26.) Mc Guire, J.S., Tomkins, G.M., Nature 182, 261 (1958)
- 27.) Gordon, G.G., Altman, K., Southren, A.L., Olivo, J., J. Clin. Endocrin. 32, 457 (1971)
- 28.) Gordon, G.G., Southren, A.L., Tochimoto, S., Olivo, J., Altman, K., Rand, J., Lemberger, L., J. Clin. Endocrin. 30, 449 (1970)
- 29.) Herbst, A.L., Yates, F.E., Glenister, D.W., Urquhart, J., Endocrinology 67, 222 (1960)
- 30.) Schriefers, H., Wassermuth, E., Laufers, K., Z. Physiol. Chem. 350, 183 (1969)
- 31.) Schriefers, H., Pittel, M., Pohl, F., Acta Endocrin. 40, 140 (1962)
- 32.) Frederiksen, D.W., Wilson, J.D., J. Biol. Chem. 246, 2584 (1971)
- 33.) Mc Guire, J.S., Hollis, V.R., Jr., Tomkins, G.M., J. Biol. Chem. 235, 3112 (1960)
- 34.) Leybold, K., Staudinger, Hj., Biochem. Zeitschr. 337, 320 (1963)
- 35.) Leybold, K., Staudinger, Hj., Arch. Biochem. Biophys. 96, 626 (1962)
- 36.) Tomkins, G.M., Recent Progr. in Horm. Res. 12, 125 (1956)
- 37.) Schriefers, H., Pittel, M., Holbach, H., Z. Physiol. Chem. 336, 163 (1964)
- 38.) Zimigrod, A., Lindner, H.R., Acta Endocrin. 61, 618 (1969)
- 39.) Repke, K., Samuels, L.T., Biochem. 3, 685 (1964)
- 40.) Repke, K., Samuels, L.T., Biochem. 3, 689 (1964)
- 41.) Bell, E.T., Popoala, E.T., Taylor, W., Biochem. J. 82, 42 (1962)
- 42.) Kupfer, D., Foricelli, E., Dorfman, R., J. Biol. Chem. 235, 1968 (1960)
- 43.) Björkheim, J., Europ. J. Biochem. 8, 345 (1969)
- 44.) Yusuf, J., Abul-Haji, Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 766 (1971)
- 45.) Davidson, S.J., Talalay, P., J. Biol. Chem. 241, 906 (1966)
- 46.) Miller, G., Anal. Biochem. 31, 964 (1959)

- 47.) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 48.) Cohn, E.J., Hughes, W.L., Jr., Wearl, J.H., J. Am. Chem.
Soc. 51, 1753 (1963)
- 49.) Beisenherz, G., Bolze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade,
K.H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G., Z. Naturforsch. 8b,
555 (1953)
- 50.) Warburg, O., Christian, W., Biochem. Zeitschr. 310, 384
(1941)
- 51.) Schneider, W.C., Hogeboom, G.H., J. Biol. Chem. 183, 123
(1950)
- 52.) Weichselbaum, T., Margraf, H.W., J. of clin. Endocrin. and
Metab. XVII (8), 959 (1957)
- 53.) Sungman Cha, Mol. Pharmacol. 4, 621 (1968)
- 54.) Morton, R.K., Nature 166, 1092 (1950)
- 55.) Fleischer, S., Fleischer, B., in "Meth. of Enzymol." X
p. 410 (1967)
- 56.) Di Jeso, F., J. Biol. Chem. 243, 2022 (1968)
- 57.) Chance, B., Hollunger, B., J. Biol. Chem. 238, 418 (1963)
- 58.) Mahler, H.R., Cordes, E.H., in "Biological Chemistry",
Harper & Row Inc. N.Y., sixth printing, p. 602 (1969)
- 59.) Williams, R.T., in "Enzymes and Drug Action", Eds Mongar,
J.L., de Reuck, A.V.S., J & A Chruchill Ltd., London, p. 241
(1962)
- 60.) Kamen, M.D., Korio, T., Ann. Rev. Biochem. 39, 686 (1970)
- 61.) Conney, A.H., Levin, W., Ikeda, M., Kuntzman, R., J. Biol.
Chem. 243, 3912 (1968)
- 62.) Tepley, T.R., Mannering, G.J., Mol. Pharmacol. 4, 10 (1968)
- 63.) Axelrod, J., Reichenthal, J., Brodie, B.B., J. Pharmacol.
exp. Ther. 112, 49 (1954)
- 64.) Netter, K.J., Arch. exp. Path. Pharmacol. 238, 292 (1960)
- 65.) Torielli, N.F., Slater, T.F., Biochem. Pharmacol. 20, 2027
(1971)
- 66.) Frost, P., Gomez, E.C., Weinstein, W.D., Lamas, J., Hsia,
S.L., Biochem. 8, 948 (1969)
- 67.) Alvares, A.P., Mannering, G.J., Mol. Pharacol. 6, 206 (1970)
- 68.) Razin, S., Biochem. Biophys. Acta 265, 241 (1972)
- 69.) Kahane, J., Razin, S., Biochem. Biophys. Acta 249, 169
(1971)

- 70.) Yu, B.P., Masoro, E.J., Biochem. 9, 2909 (1970)
- 71.) Salton, M.R., Netschey, A., Biochem. Biophys. Acta 107, 539 (1965)
- 72.) Rosenberg, S.A., Mc Intosh, J.R., Biochem. Biophys. Acta 163, 285 (1968)
- 73.) Ne'eman, Z., Kahane, J., Razin, S., Biochem. Biophys. Acta 249, 169 (1971)
- 74.) Loach, P.A., Sekura, D.L., Hadsell, R.M., Stemer, A., Biochem. 9, 724 (1970)
- 75.) Ne'eman, Z., Kahane, J., Kovartovsky, J., Razin, S., Biochem. Biophys. Acta 266, 255 (1972)
- 76.) Selinger, Z., Klein, M., Amsterdam, A., Biochem. Biophys. Acta 183, 19 (1969)
- 77.) Auburn, J.J., Eyring, E.M., Choules, G.L., Proc. Natl. Acad. Sci. US 68, 1996 (1971)
- 78.) Ichikawa, Y., Mori, K., Yamano, T., Kosokagaku-Symposium 18, 40 (1966)
- 79.) Lu, A.Y.H., Levin, W., Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1334 (1972)
- 81.) Bassham, J.A., Birt, L.M., Hems, R., Loening, U.E., Biochem. J. 73, 49 (1959)
- 82.) Taylor, W., Biochem. J. 56, 463 (1954)
- 83.) Lardy, H.A., Wellman H., J. Biol. Chem. 201, 357 (1953)
- 84.) Slater, E.C., Proc. Intern. Congr. Biochem. 5th, Moskau 5, 325 (1961) Pergamon Press, N.Y., 1963
- 85.) Guiditta, A., Strecker, H.J., Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 159 (1960)
- 86.) Wosilait, W.D., Nason, A., Meth. of Enzymol. Vol II p. 725 (1955)
- 87.) Mahler, H.R., Cordes, E.H., "Biological Chemistry", Harper & Row Inc. N.Y., sixth printing p. 613 (1969)
- 88.) wie unter 87.), p. 496
- 89.) Appleby, C.A., in Data for Biochem. Res., p. 380 (1969) Editor Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, H.W., Jones, K.M., Oxford at the Clarendon Press
- 90.) Crane, F.L., in "Biological Oxidations" p. 543 (1968) Editor Singer, T.P., Interscience Publishers, N.Y.
- 91.) Cohen, B.S., Estabrook, R.W., Arch. Biochem. Biophys. 143, 54 (1971)

- 92.) Nishibayashi-Yamashita, H., Sato, R., J. of Biochem. 67, 199 (1970)
- 93.) Omura, T., Takesue, S., J. of Biochem. 67, 249 (1970)
- 94.) Hellerman, L., Lindsay, A., Bovarnik, M.R., J. Biol. Chem. 103, 553 (1946)
- 95.) Leonhauser, S., Leybold, K., Krisch, K., Staudinger, H., Gale, P.H., Page, A.C., Jr., Folkers, K., Arch. Biochem. Biophys. 96, 580 (1962)
- 96.) Jayaraman, J., Ramasarma, T., Arch. Biochem. Biophys. 103, 258 (1963)
- 97.) Masters, B.S.S., Kamin, H., Gibson, Q.H., Williams, C.H., Jr., J. Biol. Chem. 240, 921 (1965)
- 98.) Kamin, H., Masters, B.S.S., Gibson, Q.H., Williams, C.H., Jr., Fed. Proc. 24, 1164 (1965)
- 99.) Handler, P., Rajagopalan, K.V., Aleman, V., Fed. Proc. 23, 30 (1964)
- 100.) Nyquist, S.E., Barr, R., Morr  , D.J., Biochem. Biophys. Acta 208, 532 (1970)
- 101.) Schulze, H.-U., Staudinger, H., Z. Physiol. Chem. 352, 1659 (1971)
- 102.) Schriefers, H., Cremer, W., Otto, M., Z. Physiol. Chem. 348, 183 (1967)

Lebenslauf

Am 29.10.1943 wurde ich, Sighart, Walter Golf, als Sohn des Diplomlandwirtes Dr. Hartwig Golf und seiner Ehefrau Margarete, geb. Kockel, in Malenz, Kr. Konin, geboren.

Ostern 1950 wurde ich in die Volksschule Ober-Moos, Kr. Lauterbach, eingeschult. Im Frühjahr 1954 bestand ich die Aufnahmeprüfung der Tilemannsschule Limburg/Lahn. An dieser Schule legte ich Ostern 1963 die Reifeprüfung ab. Nach einem zweijährigem Wehrdienst begann ich im Frühjahr 1965 das Studium der Biologie an der Justus Liebig-Universität in Giessen. 1967 legt ich in Giessen das Vordiplom in Biologie ab. Von September 1968 bis Februar 1970 studierte ich mit Hilfe eines Fulbright-Stipendiums an der Kansas State University, Manhattan, KS, 66502, USA, Biochemie und erhielt im Sommer 1970 den Titel "Master of Science" unter anderem für meine Thesis "Comparative Studies on Chloroperoxidase Structure". Von März 1970 bis August 1970 hielt ich mich am Biochemischen Institut der Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, als "Professor visitante" auf und arbeitete über die Reinigung einer Fructose-1,6-Diphosphatase aus Fischleber.

Seit November 1970 bin ich mit der vorliegenden Dissertation am Biochemischen Institut der Universität Giessen beschäftigt.

Seit März 1970 bin ich mit Ellen, geb. Speer verheiratet. Wir haben eine Tochter, Ulrike.

Dem Direktor des Biochemischen Institutes der Justus Liebig-Universität Giessen, Herrn Prof. Dr. HJ. Staudinger, danke ich, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Arbeitskreis die vorliegenden Untersuchungen, an denen er stets durch Diskussionen und Anregungen Anteil genommen hat, durchzuführen.

Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. V. Graef für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas und für seine Anleitung bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie Herrn R. Roth und Frau M. Bernstein für die technische Assistenz. Weiterhin danke ich allen übrigen Angehörigen des Biochemischen Institutes, die durch ihre stete Hilfsbereitschaft mitgeholfen haben, die vorliegende Arbeit zu erstellen.

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 131 Ruf (06 41) 2 17 12